



**Rui Miguel de
Andrade Domingues**

**Extracção e isolamento de triterpenóides de elevado
valor comercial a partir da biomassa de *E. globulus***

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais Derivados de Recursos Renováveis, realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Carlos Pascoal Neto, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

"Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo."

Confúcio

o júri

presidente

Doutor Dmitry Victorovich Evtyugin

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade Aveiro

Doutor Carlos Pascoal Neto

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade Aveiro

Doutor José Albertino Almeida Figueiredo

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior

agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, o Prof. Doutor Armando J. D. Silvestre e o Prof. Doutor Carlos de Pascoal Neto, pela orientação científica e pelo seu apoio e disponibilidade demonstrada ao longo deste trabalho.

À Doutora Carmen Freire pelo enorme apoio inicial e a importância que teve na minha capacitação para a realização deste trabalho.

Ao Eng. Gabriel Sousa e Eng. José Luís Amaral do Instituto Raiz pela sempre estreita colaboração e interesse demonstrado no desenvolvimento deste projecto.

Ao Prof. Doutor Carlos M. S. Silva e à colega Cláudia Passos pela colaboração indispensável na realização das extracções com CO₂ supercrítico.

Quero também endereçar um agradecimento especial aos meus colegas de laboratório, mas sobretudo amigos, Gil Gonçalves, Ricardo Pinto, Carlos Granadeiro e Doutora Paula Pinto, bem como a todos os outros membros do Grupo de Materiais Macromoleculares e Lenhocelulósicos pelo apoio e amizade partilhada durante este tempo que percorremos juntos.

Ao Raiz, Instituto de Investigação da Floresta e do Papel, agradeço o indispensável apoio financeiro através da concessão de uma bolsa de investigação e o fornecimento das amostras que compõem este estudo.

palavras-chave

Bio-refinaria, biomassa, extractáveis lipofílicos, triterpeóides, *Eucalyptus globulus*

resumo

A indústria da pasta e papel ocupa actualmente um lugar de destaque na economia nacional. Atendendo à importância deste sector torna-se importante valorizar alguns dos seus subprodutos e resíduos. Este trabalho pretende avaliar o potencial dos resíduos de biomassa de *E. globulus* como fonte de triterpenóides, em particular, ácidos triterpénicos do tipo ursano e oleanano na perspectiva da bio-refinaria integrada no sector da pasta de papel. Neste sentido, é dada particular relevância à análise da casca que pode ser facilmente explorada de forma integrada com a produção de pasta de papel, após o descasque e antes da sua alimentação à caldeira de biomassa. Numa segunda fase foram estudadas outras fracções de biomassa de *E. globulus* resultantes da sua exploração florestal.

Os extractos lipofílicos das fracções de biomassa seleccionadas foram submetidos a caracterização detalhada por cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS).

A análise das amostras de casca industrial revelou teores em triterpenóides inferiores aos referidos na literatura, em particular no que diz respeito aos ácidos triterpénicos. A fim de clarificar a origem das diferenças observadas, analisaram-se de seguida um conjunto de amostras da casca recolhidas na floresta, no parque de madeiras e ao longo da linha de descasque. Os teores em triterpenóides observados na casca total recolhida na floresta (3,8 g/kg) estão de acordo com os descritos na literatura, indicando que a variabilidade natural da matéria-prima não justifica os baixos teores observados na casca industrial. Por outro lado, o elevado teor de triterpenóides (31,5 g/kg) detectados na camada superficial das mesmas amostras de casca, confirmam que estes compostos estão essencialmente concentrados nesta fracção de casca e, por isso, são susceptíveis de remoção durante o processo de descasque. A análise de amostras da casca total provenientes do parque de madeiras revelou teores de triterpenóides (3,6 g/kg) que não exibem variações significativas face aos observados nas amostras de casca recolhidas nas plantações, não justificando, por isso, os baixos teores em triterpenóides da casca industrial. Relativamente à análise das amostras provenientes dos processos de descasque, verificou-se que estes processamentos assumem particular relevância no que respeita à remoção da fracção superficial da casca externa, mais susceptível à remoção mecânica, sendo estes responsáveis pela diminuição substancial (82%) dos teores de triterpenóides na casca industrial.

Foi ainda estudada a viabilidade de extracção dos triterpenóides a partir de outros resíduos florestais de *E. globulus* nomeadamente, a cera das folhas (juvenis e adultas), frutos e ramagem. Estes compostos estão especialmente concentrados na camada superficial da casca dos ramos (121 g/kg). O estudo pormenorizado de várias secções de casca do tronco revelou ainda que o teor em triterpenóides tende a aumentar da base para o topo da árvore, confirmando a potencialidade dos resíduos florestais do topo de *E. globulus* para a exploração destes compostos.

Considerando as crescentes pressões no sentido da indústria substituir gradualmente o uso de solventes orgânicos por solventes considerados “verdes”, iniciou-se um estudo de avaliação da viabilidade de extracção dos triterpenóides da casca externa com CO₂ supercrítico. Os extractos recolhidos apresentam composições qualitativamente semelhantes aos extractos em diclorometano, sendo os triterpenóides a família mais representativa nos extractos recolhidos. Contudo, observaram-se baixos teores, dos ácidos ursólico e oleanólico nestes extractos, uma diferença significativa relativamente ao extracto em diclorometano nos quais estes compostos são abundantes. A optimização deste processo de extracção será uma etapa fundamental no desenvolvimento futuro do aproveitamento deste tipo de compostos.

keywords

Bio-refinery, biomass, lipophilic extractives, triterpenoids, *Eucalyptus globulus*

abstract

The pulp and paper industry plays an important role in the national economy. Considering the importance of this sector, the valorization of some of its byproducts is an important topic. The aim of the present work is to evaluate the potential of *E. globulus* biomass residues as a source of triterpenoids, and particularly triterpenic acids with ursane and oleanane skeletons, within the perspective of the bio-refinery integrated in the pulp and paper industry. In that way, particular relevance was given to the bark analysis, since this fraction can be easily exploited, in an integrated way with the pulp and paper production, after the debarking stage and before feeding it the biomass boiler. In a second phase, other *E. globulus* biomass fractions, resulting from forestry exploitation activities were also studied.

Lipophilic extractives of selected biomass fractions were characterized in detail by Gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS).

The analysis of industrial bark samples revealed lower triterpenoids contents comparing to published results, particularly in what concerns to triterpenic acids.

In order to understand the origin of the observed differences, several samples from forest, wood park and several points along the debarking line, were also analyzed.

The triterpenoids content detected in total bark samples from forest (3,8 g/kg) are in agreement with literature data, indicating that natural variability of the feedstock doesn't explain the low content of triterpenoids observed in industrial bark. Furthermore, the high triterpenoids content (31,5 g/kg) detected in the superficial layer of these samples, confirmed that these compounds are essentially concentrated in the outermost layers of bark. As a consequence, being susceptible to unwanted removal during the debarking process. Analysis of bark samples from wood park revealed a triterpenoids content (3,6 g/kg) with no significant variation regarding to the contents detected in forest collected samples and therefore do not explain the low triterpenoids content found in industrial bark samples. The analysis of bark samples collected from different points of the debarking line have shown that during this process part of the outermost layers of bark are removed, being responsible for a substantial lowering of the triterpenoids content (82%) in the industrial bark.

The potentiality of extracting triterpenoids from other *E. globulus* forestry residues, namely, leaves (juvenile and adult), fruits and branches waxes, was also studied. These compounds are highly concentrated in the superficial layer of branches bark (121 g/kg). Additionally, the study of triterpenoids content in several trunk bark sections revealed that this compounds content tends to increase along the trunk, confirming the potentiality of forestry residues from *E. globulus* for exploitation of these compounds.

Considering the growing pressures in order to gradually move from organic solvents to the so called “green” extraction systems, an evaluation study on the viability of extraction of triterpenoids from *E. globulus* external bark with supercritical CO₂. The collected extracts have shown qualitative compositions similar to that of the dichloromethane extracts with triterpenoids as the major components. However, ursolic and oleanolic acids are poorly extracted, an important difference regarding to dichloromethane extract where these compounds are major components. Optimization of this extraction process will be a key phase for future development on the exploitation of these compounds.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	3
1.1	CONCEITO DE BIO-REFINARIA	5
1.2	RECURSOS FLORESTAIS E A INDÚSTRIA DA PASTA E DO PAPEL PORTUGUESA	7
1.2.1	<i>Conceito de bio-refinaria na Indústria da pasta e do papel.....</i>	<i>9</i>
1.2.2	<i>Bio-refinaria na Indústria da pasta e do papel em Portugal: exploração dos extractáveis</i>	<i>13</i>
1.3	MÉTODO DE EXTRACÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	18
1.4	OBJECTIVOS DO PROJECTO	20
2	MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1	AMOSTRAS DE BIOMASSA DE <i>E. globulus</i>	22
2.1.1	<i>Casca Industrial</i>	<i>22</i>
2.1.2	<i>Casca processada pela linha de descasque</i>	<i>22</i>
2.1.3	<i>Outras fracções de biomassa do E. globulus</i>	<i>24</i>
2.2	PROCEDIMENTOS DE EXTRACÇÃO DAS AMOSTRAS DE BIOMASSA DE <i>E. globulus</i>	26
2.2.1	<i>Amostras de casca</i>	<i>26</i>
2.2.2	<i>Amostras de folhas e frutos.....</i>	<i>26</i>
2.2.3	<i>Amostras dos ramos do topo.....</i>	<i>27</i>
2.2.4	<i>Extracção da casca externa do tronco com CO₂ supercrítico.....</i>	<i>27</i>
2.2.4.1	Extractor de CO ₂ supercrítico	27
2.2.4.2	Procedimento de extracção com CO ₂ supercrítico.....	28
2.3	<i>Derivatizações e análises GC-MS.....</i>	<i>29</i>
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1	DENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS LIPOFÍLICOS MAIS ABUNDANTES NOS EXTRACTOS DA BIOMASSA DE <i>E. globulus</i> : EXTRACTO DE CASCA INDUSTRIAL	32
3.2	ANÁLISE DO TEOR EM TRITERPENÓIDES NA CASCA DA MADEIRA DO <i>E. globulus</i>	38
3.2.1	<i>Teor em triterpenóides da casca industrial</i>	<i>38</i>
3.2.2	<i>Teor em triterpenóides da casca total do tronco de E. globulus.....</i>	<i>41</i>
3.2.3	<i>Teor em triterpenóides da camada superficial da casca do tronco</i>	<i>42</i>
3.2.4	<i>Teor em triterpenóides da casca do parque de madeiras.....</i>	<i>44</i>
3.2.5	<i>Teor em triterpenóides da casca ao longo da linha de descasque</i>	<i>45</i>
3.3	ANÁLISE DO TEOR EM TRITERPENÓIDES DOS RESÍDUOS FLORESTAIS DE <i>E. globulus</i>	48
3.3.1	<i>Teor em triterpenóides da cera cuticular das folhas de E. globulus</i>	<i>49</i>
3.3.2	<i>Teor em triterpenóides da cera cuticular dos frutos de E. globulus.....</i>	<i>53</i>
3.3.3	<i>Teor em triterpenóides da cera superficial dos ramos do topo de E. globulus</i>	<i>54</i>
3.3.4	<i>Teor em triterpenóides da camada superficial da casca dos ramos.....</i>	<i>57</i>
3.3.5	<i>Análise comparativa dos teores em triterpenóides entre as ceras dos resíduos da biomassa de E. globulus</i>	<i>59</i>
3.3.6	<i>Variabilidade do teor em triterpenóides na casca total do tronco</i>	<i>60</i>
3.3	ESTUDOS PRELIMINARES DE EXTRACÇÃO DA CASCA EXTERNA DE <i>E. globulus</i> COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	61
4	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	65
	REFERÊNCIAS.....	68

1

Introdução

No decorrer do século XX assistiu-se ao crescimento exponencial da indústria petroquímica. Este crescimento alterou de forma radical as realidades económicas e sociais nos países desenvolvidos onde os recursos fósseis são usados como fonte de energia, combustíveis e num incontável número de produtos hoje presentes no nosso quotidiano.

A excessiva dependência da sociedade actual dos recursos fósseis é uma evidência incontornável, aceite hoje como um problema do presente e não como um problema a enfrentar no futuro. Para contornar e ultrapassar este problema, a sociedade deve iniciar a transição gradual de um modelo de desenvolvimento sustentável assente num recurso não renovável para um modelo baseado em recursos renováveis [1].

No sentido de se alcançar a referida transição, o início de uma nova revolução industrial está já em curso. Começamos hoje, cada vez mais, a pensar “sustentável” e “verde” [2]. Enquanto o século XX viu o emergir e o amadurecer de uma indústria química orgânica baseada na refinação de petróleo, o século XXI presenciará o renascer e o desenvolvimento de uma nova indústria orgânica baseada na refinação de biomassa [3].

Esta indústria será a base da chamada bio-economia que poderá contribuir com soluções viáveis para uma série de problemas sistemáticos onde se incluem as alterações climáticas, os poluentes orgânicos, os resíduos municipais, industriais e agro-florestais, e o fortalecimento das economias baseadas na agricultura e na floresta [2].

Um modelo de desenvolvimento sustentável baseado na biomassa irá promover o desenvolvimento de três sectores distintos que constituirão a base da bio-economia: bio-energia, bio-combustíveis e bio-materiais / bio-produtos [4].

A produção de energia a partir de recursos renováveis é já hoje uma realidade em crescimento acelerado, movida, não só, pela repercussão das constantes e imprevisíveis oscilações dos preços do petróleo nas economias mundiais, mas principalmente pelos crescentes problemas ambientais, como o agravamento do efeito de estufa, e a

consequente necessidade, cada vez mais premente, de serem cumpridos os objectivos do protocolo de Quioto.

Contudo, enquanto o sector da energia pode direccionar-se para várias fontes renováveis alternativas (vento, sol, água, biomassa, fusão e cisão nuclear), o sector dos produtos químicos, materiais e também dos combustíveis dependerá, na perspectiva actual, essencialmente da biomassa, particularmente da biomassa vegetal [5].

Do ponto de vista dos materiais, o sucesso desta transição irá depender de até onde seremos capazes de substituir gradualmente a produção de bens actuais a partir de fontes fósseis não renováveis, por uma produção provenientes da biomassa vegetal. Os números são potencialmente aliciantes, considerando que a partir das cerca de 170×10^9 ton de biomassa que se estima serem produzidas anualmente por fotossíntese, apenas cerca de 6×10^9 ton são actualmente usadas e destas, apenas 3% se destinam a fins não alimentares [5, 6]. O maior desafio encontra-se no desenvolvimento das tecnologias necessárias para tornar esta transição viável.

Para garantir o sucesso desta transição há que considerar aspectos de vital importância tais como selecção adequada das espécies de plantas, o aumento da produtividade com o uso racional dos solos, fertilizantes, pesticidas e água, o uso de organismos geneticamente modificados, etc. [7].

Além das preocupações acima referidas por parte da comunidade internacional, há ainda a considerar a questão da concorrência directa com a produção alimentar. É necessário compreender de que forma a pressão sobre este sector se repercutirá na disponibilidade e nos preços destes produtos [7, 8]. Estima-se que os sistemas mundiais de produção alimentar terão de satisfazer as necessidades de mais 750 milhões de pessoas até 2015 sendo que este crescimento populacional ocorrerá num contexto em que a população urbana nos países em desenvolvimento aumentará e as comunidades rurais e agrícolas envelhecerão [8]. É com este cenário que se debaterá o desenvolvimento da chamada bio-economia [9].

É óbvio a que o desenvolvimento dos vários sectores da bio-economia não será a única solução para as questões relacionadas com a substituição dos recursos fósseis, mas podem certamente oferecer um enorme contributo nesse sentido, especialmente no

sector dos bio-materiais / bio-produtos onde presentemente não parecem existir outras alternativas viáveis.

A importância dos recursos florestais na dinâmica da economia Portuguesa é sobejamente conhecida. Entre as actividades relacionadas com a exploração florestal em Portugal, a indústria da pasta e do papel, baseada sobretudo na exploração do *Eucalyptus globulus*, é um dos sectores mais importantes. Os recentes desenvolvimentos da bio-economia e a consequente emergência do conceito de bio-refinaria despertaram o interesse para a exploração e valorização dos subprodutos e dos resíduos florestais resultantes da sua laboração.

Os parágrafos seguintes pretendem descrever e apontar as oportunidades da implementação do conceito de bio-refinaria neste sector industrial no contexto nacional, focando o potencial da exploração dos seus subprodutos e, principalmente, dos seus resíduos florestais.

1.1 Conceito de bio-refinaria

No âmbito do desenvolvimento dos vários sectores da bio-economia surge o conceito de bio-refinaria. Uma bio-refinaria pode ser considerada uma unidade industrial que integra múltiplos processos de conversão da biomassa para produzir combustíveis, energia, produtos químicos e materiais que se enquadram num binómio reduzido volume / alto valor acrescentado ou elevados volumes / baixo valor acrescentado (figura 2) [4-7, 10]. Estas indústrias são optimizadas no sentido de maximizar a produção dos produtos com maior valor acrescentado minimizando simultaneamente os desperdícios através da sua respectiva conversão em energia/combustíveis [10].

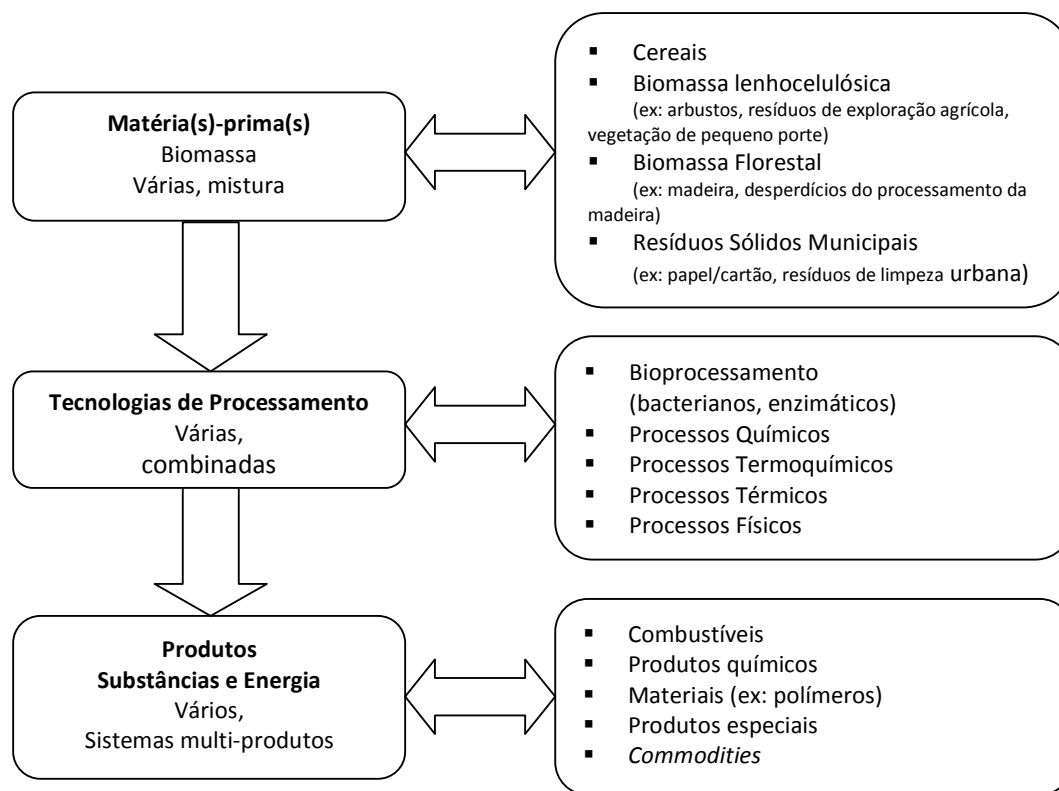


Figura 2: Representação esquemática dos princípios básicos de funcionamento de uma bio-refinaria (adaptado de [5]).

As bio-refinarias podem ser classificadas segundo vários critérios baseando-se nas suas tecnologias de processamento, nas matérias-primas usadas ou no seu desenvolvimento tecnológico [5, 6, 10].

Kamm *et al.* [5, 6] descreveram e classificaram as bio-refinarias em três grupos, conhecidas como bio-refinarias de fase I, II e III, tendo por base os respectivos níveis de desenvolvimento. Uma bio-refinaria de fase I tem capacidades de processamento fixas e pouco flexíveis no que se refere às matérias-primas. As bio-refinarias de fase II têm as mesmas limitações que as de fase I ao nível da matéria-prima processada, mas tem maior flexibilidade produtiva e a capacidade de produzir vários produtos finais dependendo das necessidades do mercado. As bio-refinarias mais desenvolvidas são as designadas de fase III e combinaram na mesma unidade industrial diferentes tecnologias de conversão para processar o maior número de fracções de biomassa possíveis, maximizando os níveis de flexibilidade relativamente às matérias-primas, produtos e energia/combustíveis gerados. Quando várias tecnologias de conversão, como a transformação química/bioquímica e

termoquímica, são combinadas numa mesma unidade industrial, as bio-refinarias são também designadas bio-refinarias integradas [10].

As bio-refinarias de fase III, nomeadamente, as bio-refinarias de plantas verdes (*green biorefinery*), de colheitas integrais (*whole-crop*) e de materiais lenhocelulósicos (LCF, do inglês *ligno-cellulosic feedstock*), encontram-se ainda em fase de estudo e desenvolvimento, não estando completamente estabelecidas [10].

Como será discutido num dos pontos seguintes, numa primeira fase, as bio-refinarias de LCF poderão ser desenvolvidas com base nas infra-estruturas das indústrias de pasta já existentes, evitando os investimentos iniciais intensivos, focando-se na exploração dos resíduos resultantes dos processos de produção de pasta (extractáveis, lenhina e hemiceluloses) sem interferir com a sua produção em larga escala [11].

1.2 Recursos florestais e a Indústria da pasta e do papel Portuguesa

Segundo dados da Direcção Geral das Florestas (DGF), a floresta portuguesa ocupa actualmente cerca de $3,4 \times 10^6$ ha, ou seja, cerca de 38% do território continental [12]. A área arborizada tem, inclusivamente, condições para aumentar, caso sejam aproveitadas as extensas áreas de incultos e improdutivo que, segundo a DGF, ocupam aproximadamente $2,3 \times 10^6$ ha.

Quanto à distribuição das áreas dos povoamentos florestais por espécie dominante a nível nacional, verifica-se que o pinheiro bravo (*Pinus pinaster*), o sobreiro (*Quercus suber*), o eucalipto (maioritariamente *Eucalyptus globulus*) e a azinheira (*Quercus ilex*) são as quatro principais espécies, ocupando, em conjunto, quase 85% da área da floresta portuguesa

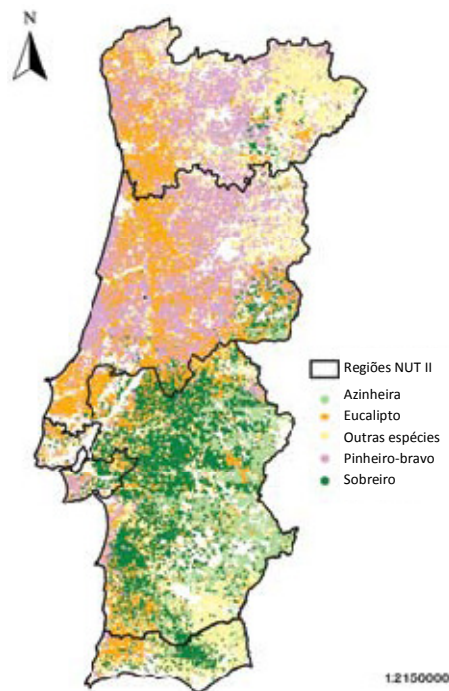


Figura 1: Área florestal por espécie dominante em 2005/2006 [12]

(figura 1) [12].

O eucalipto é a terceira espécie dominante a seguir ao pinheiro-bravo e ao sobreiro, ocupando $7,5 \times 10^5$ ha, o que representa cerca de 7% do território continental e aproximadamente 20% da floresta nacional. A expansão das espécies de eucalipto, principalmente do *E. globulus*, é relativamente recente em Portugal (meados do séc. XX) e coincide com a instalação e crescimento da indústria papelreira [13, 14].

Actualmente, o *E. globulus* é a principal fonte de fibras para a produção de pasta e papel em países como Portugal e Espanha. No ano de 2006, foram produzidas em Portugal $2,1 \times 10^6$ ton de pasta correspondendo ao consumo de $4,8 \times 10^7$ m³ de madeira de eucalipto [12].

Sendo a desflorestação uma das causas responsáveis pelas alterações climáticas, em sentido inverso, a reflorestação e a florestação apresentam-se como soluções para este problema já que as florestas em crescimento sequestram CO₂. Assim, as florestas geridas de forma sustentável são consideradas neutras no que diz respeito às emissões de CO₂ pois mantêm a biomassa média constante ao longo do tempo. A indústria da pasta e do papel gere directamente cerca de $2,0 \times 10^5$ ha de floresta, 77% dos quais eucalipto. A área florestal gerida por este sector é certificada ou encontra-se em processo de certificação de gestão florestal sustentável e remove da atmosfera 3 a 4 milhões de ton CO₂/ano [14].

Os produtos papelreiros são também um “sumidouro de carbono”. A pasta para papel colocada no mercado em 2004 continha $1,0 \times 10^6$ ton de C, o equivalente a $3,8 \times 10^6$ ton CO₂ e a reciclagem de $3,0 \times 10^5$ ton de papel nesse mesmo ano evitou uma emissão de $1,1 \times 10^6$ ton CO₂ para a atmosfera [14].

Conclui-se assim que a floresta nacional, em particular aquela que é gerida pelo sector da pasta e do papel, reveste-se de um cariz estratégico no sentido da sua exploração sustentável. A implementação do conceito de bio-refinaria nas indústrias de pasta contribuirá para maximizar a rentabilidade dos seus recursos florestais, valorizando os resíduos resultantes da sua exploração, obtendo assim importantes mais-valias económicas.

1.2.1 Conceito de bio-refinaria na Indústria da pasta e do papel

No que respeita à produção em massa de produtos químicos, prevê-se difícil, no imediato, a competição directa de produtos provenientes da bio-refinação com produtos similares provenientes da petroquímica [15]. Contudo, o crescente aparecimento no mercado de bio-produtos como NatureworksTM, Sorona®, Mater-Bi® ou MirelTM, competindo directamente com os produtos da petroquímica, indicam que a sua produção pode ser viável.

Actualmente, o investimento inicial intensivo é um dos grandes obstáculos ao objectivo de produzir produtos químicos derivados de biomassa em unidades fabris exclusivamente desenhadas para esse fim. No sentido de minimizar o impacto desse factor, numa primeira fase, uma possível abordagem seria a utilização dos subprodutos e resíduos de biomassa florestal em sectores como o da pasta e papel [11, 15].

A ideia da implementação do conceito de bio-refinaria na indústria da pasta e do papel, apesar de estar longe de ser novidade, ganhou recentemente novo impulso com a presente conjugação de factores ambientais, económicos e consequentemente políticos [11].

No actual contexto, a aplicação do conceito de bio-refinaria LCF baseado num modelo de bio-refinaria integrada nas fábricas de pasta e papel através da adaptação das actuais infra-estruturas produtivas de forma a desenvolver centros de produção de bio-energia e bio-produtos (figura 3), conduzirá à valorização dos subprodutos e resíduos, gerando mais-valias económicas e ambientais [7, 11, 16].

Uma das vantagens competitivas desta indústria no que se refere à implementação destes conceitos reside no facto de possuir infra-estruturas que, numa primeira fase, podem ser adaptadas à produção de subprodutos sem afectar a sua principal linha de negócio, a produção de pasta celulósica, evitando desta forma o referido investimento intensivo inicial [11]. Outro aspecto relevante reside no facto deste sector industrial ter a seu favor um historial de eficiência na exploração florestal, no transporte de grandes quantidades de biomassa e na separação dos seus componentes, factores igualmente determinantes para o sucesso do conceito de bio-refinaria [17].

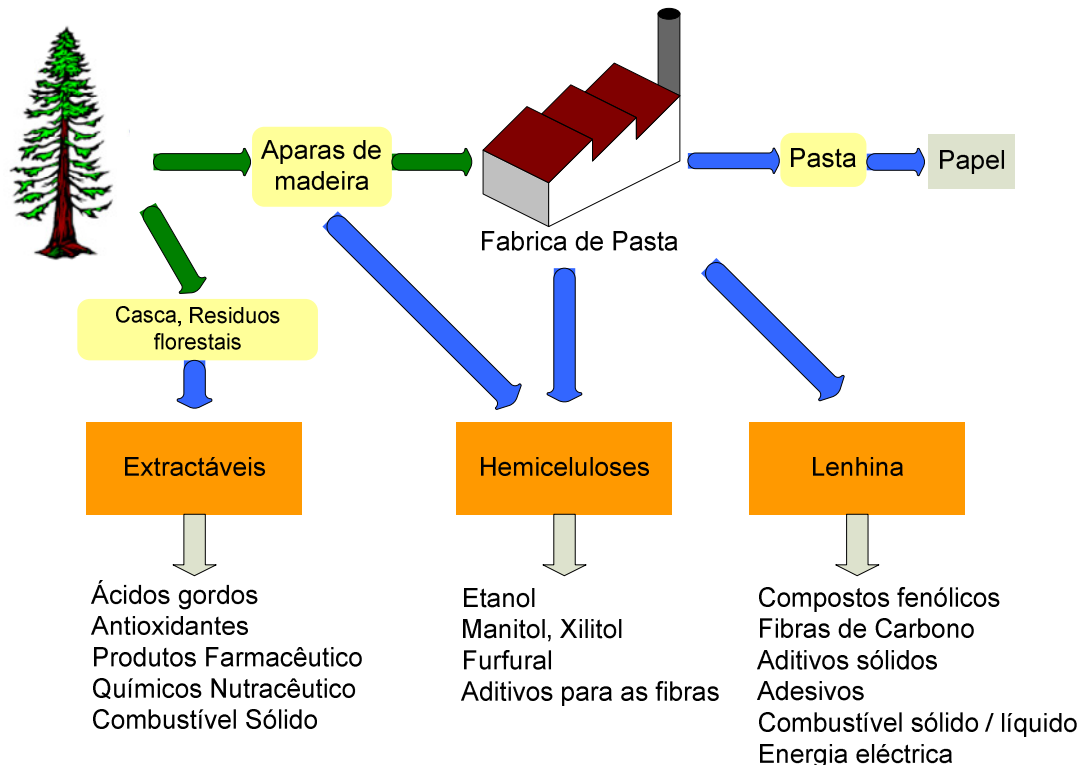


Figura 3: Possível abordagem para aplicação do conceito de bio-refinaria de materiais florestais integrada na indústria da pasta e papel [7, 15, 18].

A biomassa vegetal em geral, é constituída essencialmente por celulose, hemicelulose, lenhina, proteínas, óleos, ceras, e outras substâncias minoritárias como vitaminas, essências aromáticas e pigmentos, que apresentam estruturas químicas muito distintas [5].

No que se refere à madeira, a celulose é o constituinte maioritário, representando cerca de 40 a 50% do seu peso seco [19]. Como componente mais abundante da biomassa vegetal, a celulose terá certamente grande relevância no futuro das bio-refinarias LCF. Contudo, numa primeira fase, não será um dos objectivos da implementação do conceito de bio-refinaria integrada na indústria de pasta e papel pois interfere com a sua principal linha de negócio. Ainda assim, a longo prazo e como consequência da tendência decrescente dos preços de mercado da pasta celulósica, a celulose pode também ser usada para a produção de uma grande variedade de produtos

(por exemplo ésteres e éteres de celulose, entre outros [20, 21]) ou, noutra perspectiva, para a produção de etanol, 5-hidroximetilfurfural e sorbitol [11].

No curto prazo, a implementação do conceito de bio-refinaria LCF na indústria da pasta pode estar ligado ao aproveitamento dos seus subprodutos. De facto, uma fábrica de pasta kraft origina, paralelamente à produção de pasta, quantidades consideráveis de subprodutos (figura 3) como lenhina, hemiceluloses, extractáveis e resíduos de biomassa (como a casca ou nós de madeira) usados na sua maioria como combustível para a produção de energia [22]. O interesse nestes subprodutos tem merecido renovada atenção, tanto na sua recuperação e isolamento como produto final como na sua transformação química para posteriores aplicações [4, 11].

As madeiras de resinosas contém aproximadamente entre 25 e 30% de hemiceluloses enquanto as madeiras de folhosas apresentam valores típicos entre 20 a 35% [19]. As hemiceluloses podem ser pré-extraídas das aparas de madeira antes do cozimento da madeira ou a partir dos licores de cozimento. Dependendo da sua natureza, podem encontrar uma vasta gama de aplicações que vão desde a produção de etanol, manitol, xilitol, até à produção de furfural [10, 11].

A lenhina, por seu lado, oferece uma enorme oportunidade para o desenvolvimento operacional das bio-refinarias de LCF. Representando 26 a 32% da madeira de resinosas e 20 a 28% da madeira de folhosas [23], a lenhina é o segundo constituinte mais abundante da biomassa e a sua estrutura de natureza aromática sugerem que pode desempenhar um papel importante enquanto fonte de novos produtos químicos, sobretudo nos materiais macromoleculares e nos produtos químicos aromáticos [24], conduzindo a uma vasta família de subprodutos. Através da sua conversão termoquímica podem obter-se combustíveis e/ou energia [11, 25, 26]. Enquanto material macromolecular, a lenhina pode encontrar aplicações na produção de adesivos, como aditivo para cimentos ou ainda servindo de precursor para compostos aromáticos de baixo peso molecular como a vanilina [3, 27].

O conteúdo em extractáveis da madeira de resinosas e folhosas de zonas temperadas compreende-se entre 0,4 e 4,7%, embora possam atingir valores muito superiores em algumas resinosas e folhosas tropicais [28]. Considerando que a composição dos

extractáveis lipofílicos da madeira varia significativamente entre espécies e também entre as diferentes partes de uma mesma árvore [28, 29], o tipo de compostos que se podem explorar depende das espécies usadas na produção da pasta. Exemplos de extractáveis que podem ser recuperados nestas indústrias são as conhecidas fracções de terebentina [30] e colofónia [31], fitoesteróis [32] e lenhanos dos nós da madeira [33-36] com crescentes aplicações nutraceuticas. Por exemplo, os nós da madeira de abeto norueguês (*Picea abies*) são extremamente ricos em lenhanos (6-24% em massa), dos quais o mais abundante é hidroxi-matairesinol (figura 4) [34]. Este composto apresenta importantes propriedades anti-carcinogénicas e antitumorais [15, 37] e tem sido usado em diversas aplicações tais com preparações farmacêuticas [37], complemento alimentar comercializado sob a denominação HMRLignanTM [38], e em cosméticos e preparações dermatológicas [39].

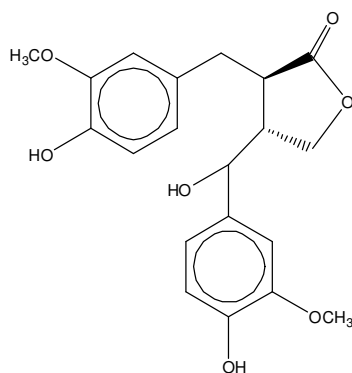


Figura 4: Estrutura do hidroxi-matairesinol [34]

Outro exemplo é a recuperação de fitoesteróis, nomeadamente o β -sitosterol (figura 5), e ácidos gordos a partir do licor negro do cozimento kraft da madeira de bétula (*Betula pendula*) [40, 41]. Estes compostos podem também ser obtidos a partir do denominado Tall Oil, sub-produto do cozimento kraft da madeira de pinho (*Pinus spp.*) [42]. Os referidos fitoesteróis são conhecidos por inibem a absorção do colesterol por via alimentar bem como a sua produção endógena [43]. Estes esteróis são ainda usados como precursores para a produção de ésteres de esterilo de forma a poderem ser incorporados em alimentos gordos [44]. Um exemplo da sua aplicação encontra-se numa margarina contendo um éster de esterilo, Benecol®, que está no mercado desde 1999 [43].

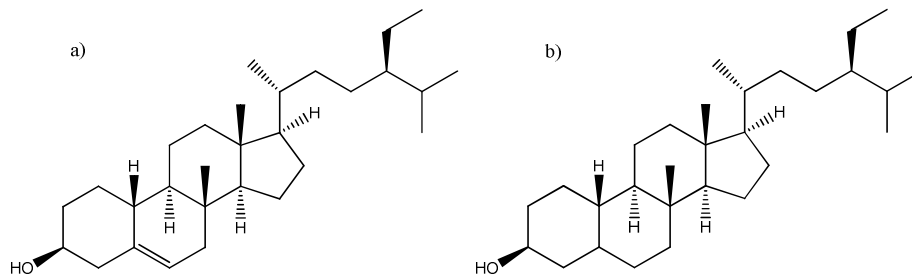


Figura 5: Estruturas do β -sitosterol (a) e β -sitostanol (b)

1.2.2 Bio-refinaria na Indústria da pasta e do papel em Portugal: exploração dos extractáveis

A madeira mais usada pela indústria da pasta e do papel na península Ibérica é o *E. globulus*, como já foi referido anteriormente. A importância que o *E. globulus* assumiu nas últimas décadas como matéria-prima para a indústria da pasta em Portugal, promoveu um interesse crescente pelo estudo das suas características, particularmente aquelas que se relacionam com o seu desempenho durante o processo de cozimento da madeira e as propriedades das pastas. Entre as características estudadas, o conteúdo em extractáveis e a composição desta fracção mereceu uma atenção particular [45-51].

Os extractáveis lipofílicos da madeira de *E. globulus* são compostos maioritariamente por fitoesteróis e ácidos gordos, seguidos por quantidades menores de álcoois alifáticos de cadeia longa e compostos aromáticos [45, 51]. Geralmente, partes significativas destes compostos encontram-se na forma esterificada [45]. Dos compostos detectados nestes extractos, os mais abundantes são o β -sitosterol e o ácido palmítico (aproximadamente 350 e 75 mg/Kg de madeira seca, após hidrólise, respectivamente) [45].

Uma vez que os processos de descasque não são completamente eficientes, há uma pequena porção de casca que acompanha as aparas de madeira no cozimento. No sentido de compreender globalmente a forma como os extractáveis lipofílicos se comportam durante o cozimento e o branqueamento da pasta e os fenómenos associados com a deposição de *pitch* [46, 47, 49, 50], estudaram-se também os extractáveis da casca do *E.*

globulus [48, 51]. Observou-se que a casca apresenta níveis de extractáveis lipofílicos bastante elevados, e, em particular na casca externa. Observou-se ainda que a fracção lipofílica da casca externa é extremamente rica em ácidos triterpénicos com estruturas do tipo lupano, ursano e oleanano, nomeadamente, os ácidos betulónico, betulínico, ursólico e oleanólico, e em β -sitosterol (figura 5), enquanto na casca interna predominam o β -sitosterol e a β -amirina juntamente com os ácidos palmítico, linoleico e oleico [48].

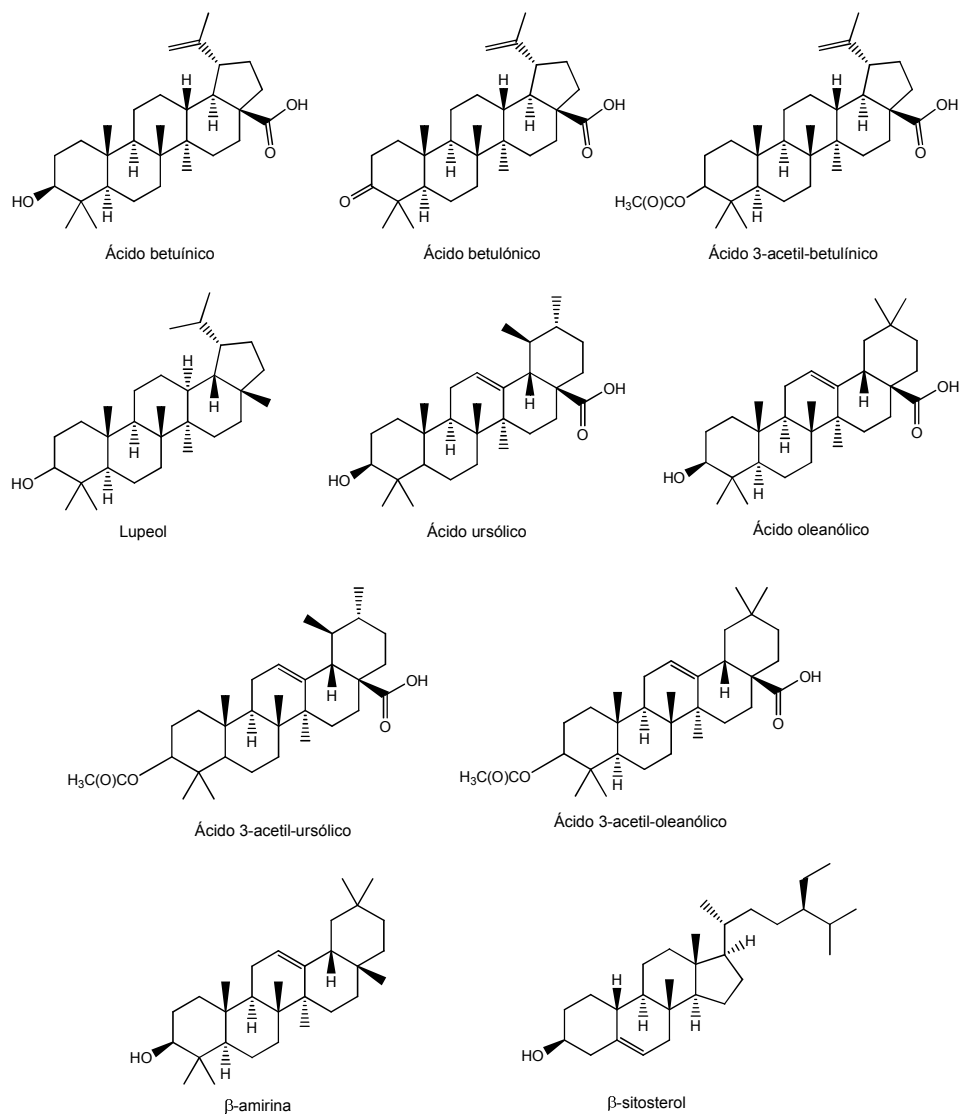


Figura 5: Estrutura dos principais triterpenóides identificados na casca de *E. globulus*

Particularmente interessante do ponto de vista da sua possível exploração, é o facto de esta fracção de triterpenóides poder representar até 25 g / kg da casca externa (figura

6) [48], valores consideravelmente elevados quando comparados com outras fracções de biomassa de *E. globulus* estudadas, como a casca interna e a madeira.

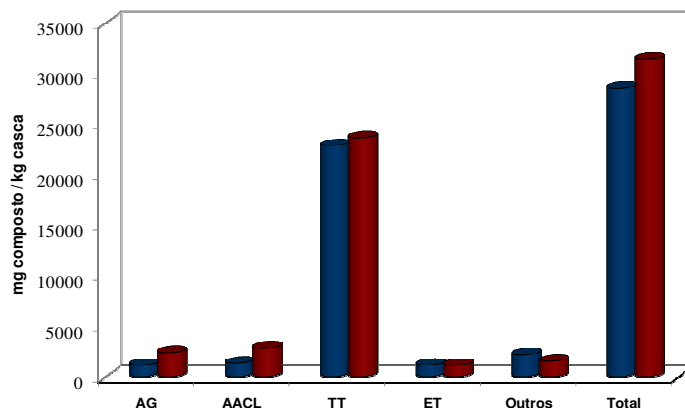


Figura 6: Principais famílias de compostos (AG – Ácidos gordos, AACL – Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa, TT - Triterpenóides e ET – Esteróis) identificados no extracto da casca exterior de *Eucalyptus globulus* com diclorometano, antes e depois de hidrólise alcalina [48].

Encontram-se publicados inúmeros estudos [52-65] relativos à actividade biológica e aplicações terapêuticas dos referidos triterpenóides e seus derivados. A grande quantidade de trabalhos publicados durante a última década dedicados ao estudo destes compostos reflecte também o crescente interesse no estudo das suas propriedades. A tabela 1 resume as principais aplicações e actividades biológicas descritas na literatura para alguns dos compostos encontrados de forma abundante na casca externa de *E. globulus*.

Tabela 1: Principais aplicações e actividades biológicas de alguns triterpenóides.

Composto	Aplicações Farmacológicas / Actividade Biológica
Ácido ursólico	Agente antitumoral [52, 58-60, 63, 65] Anti-úlceras [56] Anti-inflamatório [59, 64] Actividade antivírica e antimicrobiana [62]
Ácido oleanólico	Actividade antitumoral [59, 60] Anti-úlceras [56] Anti-inflamatória [59, 64]
Ácido betulínico	Actividade antitumoral [52] Actividade anti-HIV [53] Anti-malária [53]
β -sitosterol	Tratamento de doenças causadas por imunodeficiência [54] Tratamento de tuberculose [55] Anti-inflamatório e antipirético [57] Actividade antitumoral , antidiabético e anti-úlceras [61] Combate ao colesterol [66]

A questão que se coloca será a de avaliar em que medida os dados referentes à composição química da madeira e da casca de *E. globulus* podem servir como ponto de partida para a implementação do conceito de bio-refinaria nas indústrias do sector da pasta produzida a partir de madeira desta espécie no contexto nacional.

No caso dos extractáveis da madeira, a exploração do β -sitosterol pode ter algum interesse, principalmente se integrada com outros sistemas de exploração da madeira como a pré-extracção das hemiceluloses antes do cozimento [67], ou com o fraccionamento dos licores negros para isolar lenhinas, hemiceluloses ou compostos fenólicos.

A exploração dos extractáveis da casca perfila-se como mais prometedora. Actualmente, a casca de *E. globulus* é usada para alimentar a caldeira de biomassa destinada à produção de energia. Tendo por base os valores observados por Freire *et al.*

[48], uma fábrica de pasta kraft com uma capacidade de produção de 500 000 ton anuais de pasta branca, pode originar cerca de 100 000 ton de casca (externa+interna), a que corresponde um potencial de mais de 500 ton anuais de triterpenóides, das quais 240 ton de ácido ursólico, 80 ton de ácido oleanólico, 53 ton de ácido betulínico, 50 ton de ácido betulónico e 75 ton de β -sitosterol, entre outros (valores estimados no pressuposto de uma proporção mássica de casca externa: casca interna aproximadamente 1:8 [48, 68]).

Considerando que estes compostos triterpénicos têm elevado valor comercial e apresentam propriedades farmacológicas interessantes [60], tendo, ou podendo ter, aplicações medicinais, em cosméticos ou como aditivos alimentares [43, 66, 69], a sua exploração pode, por isso, representar um importante contributo para a valorização da biomassa de *E. globulus*.

A potencial exploração da casca pode abrir perspectivas mais abrangentes no sentido da exploração generalizada de outros resíduos florestais do *E. globulus* como as folhas, frutos e ramagens que actualmente alimentam igualmente a caldeira de biomassa. As folhas e os frutos, para além dos óleos essenciais [70], também contêm ceras epicuticulares ricas em triterpenóides e flavonóides [71-74] que podem ser facilmente extraídos (figura 7).

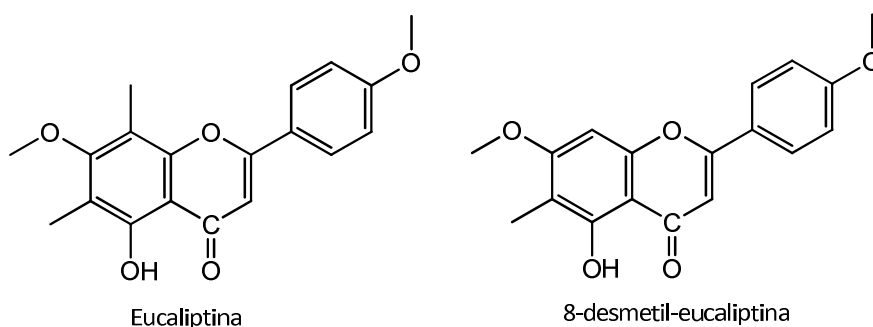


Figura 7: Estrutura de dois flavonóides identificados nas folhas de *E. globulus* que apresentam actividade antimicrobiana [74].

A integração dos processos de descasque de madeira com os processos de extracção de triterpenóides a partir dos vários resíduos de biomassa (casca, ramos, folhas e frutos), seguindo-se a posterior alimentação da caldeira de biomassa, permitiria obter produtos químicos especiais, com elevado valor acrescentado e sem prejuízo da já existente

produção de energia. Esta abordagem contribuiria para otimizar a utilização dos recursos florestais processados pelo sector da pasta celulósica nacional.

Por outro lado, é de vital importância para o sucesso do conceito de bio-refinaria que as tecnologias de extracção destes compostos se baseiem em tecnologias com baixo impacto ambiental [75]. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de tecnologias alternativas aos processos convencionais de extracção e fraccionamento com solventes que sejam simultaneamente eficientes, não tóxicas e apresentem baixo impacto ambiental, usando, por exemplo, CO₂ supercrítico e co-solventes inócuos.

1.3 Método de extracção com CO₂ Supercrítico

Os extractos de plantas são bastante usados nas indústrias alimentares, farmacêuticas e cosméticas [76]. As metodologias aplicadas à extracção destes valiosos compostos naturais a partir das plantas com o objectivo da sua comercialização, têm sido intensivamente estudados.

A extracção de amostras sólidas é normalmente realizada com os tradicionais extractores Soxhlet ou Soxtec [77]. Contudo, estes métodos consomem demasiado tempo e requerem quantidades de solventes relativamente elevadas. Por isso, na última década a investigação tem-se virado para outras técnicas de extracção como, por exemplo, extracção assistida por ultra-sons [78], extracção assistida por micro-ondas [79] ou extracção com fluidos supercríticos (EFSC) [80-82].

A extracção com fluidos supercríticos é reconhecida como uma solução tecnológica adequada para a extracção e purificação de uma variedade de compostos, particularmente para os que apresentam baixa volatilidade e/ou são susceptíveis de sofrer degradação térmica [81, 83]. O interesse na EFSC tem crescido com a imposição de restrições legais no uso de solventes convencionais na preparação de extractos destinados a fins farmacêuticos e alimentares [81-84].

O CO₂ ($P_c = 72,8$ bar; $T_c = 304,1$ K) é o solvente mais frequentemente usado para EFSC pelas vantagens operacionais que apresenta: carácter não tóxico e não inflamável, baixo custo e elevada pureza, sendo apropriado para extrair compostos naturais com baixa

volatilidade e polaridade [82]. Quando o extracto é recuperado nos colectores, o CO₂ é facilmente separado devido à sua elevada volatilidade. As propriedades físico-químicas do CO₂ supercrítico (elevada difusibilidade, baixa viscosidade e baixa tensão superficial comparativamente com os solventes convencionais) facilitam a transferência de massa e permitem operações com baixo impacto ambiental [83]. Para além disso, as propriedades dos fluidos supercríticos podem variar significativamente através da manipulação das condições operacionais (temperatura e pressão) [81]. Contudo, muitos compostos nutracêuticos, como compostos fenólicos e glicosídicos, são pouco solúveis no CO₂ e, por isso, não extraíveis [76]. Para extrair estes compostos, é necessária a adição de co-solventes orgânicos que aumentem a polaridade do CO₂.

Desde os anos 80, foram exploradas várias aplicações industriais para os fluidos supercríticos, incluídas técnicas de extracção. A aplicação mais explorada comercialmente é, sem dúvida, a descafeinação do café e do chá [85], representando uma produção anual de $1,0 \times 10^5$ ton / ano. Actualmente a EFSC é intensivamente usada em várias aplicações industriais, incluindo a extracção de óleos essenciais e compostos nutracêuticos de produtos naturais [76, 86].

A potencial exploração de triterpenóides a partir da biomassa de *E. globulus* deve considerar o uso de tecnologias limpas e ambientalmente sustentáveis. Se a isto acrescentarmos ainda as referidas restrições no uso de solventes convencionais na manipulação de compostos destinados a fins farmacêuticos e alimentares, potenciais mercados dos produtos que se pretendem extrair, a potencial extracção a nível industrial dos triterpenóides com CO₂ supercrítico pode ser uma importante componente para o sucesso deste conceito de bio-refinaria, pelo que, a sua viabilidade deve merecer a necessária atenção.

1.4 Objectivos do projecto

A indústria da pasta e papel ocupa actualmente um lugar de destaque na economia nacional. Atendendo à importância deste sector e a importância da valorização de alguns dos seus subprodutos e resíduos, este trabalho pretende avaliar a viabilidade da extracção dos triterpenóides de elevado valor da biomassa de *E. globulus* antes da sua alimentação à caldeira de biomassa, contribuindo para a implementação do conceito de bio-refinaria integrada neste sector industrial.

Assim, em colaboração com a indústria da pasta e do papel, este trabalho irá centrar-se em:

- 1) caracterizar detalhadamente a composição química da casca de *E. globulus* em diversos pontos na unidade fabril;
- 2) seleccionar os melhores pontos para recolher a casca no sentido de uma eventual exploração destes compostos;
- 3) avaliar a aptidão de outras fracções de biomassa de *E. globulus* como ramos, folhas e frutos, para a extracção de triterpenóides;
- 4) testar sistemas de extracção e separação usando CO₂ supercrítico.

2 Materiais e Métodos

Foram recolhidas para este estudo diferentes fracções de biomassa de *E. globulus*.

As amostras de casca industrial e do parque de madeiras foram recolhidas na fábrica Portucel em Cacia. Os resíduos da sua exploração florestal, nomeadamente folhas, ramos e frutos, e a casca da árvore são provenientes de uma plantação de clones da Quinta de São Francisco em Eixo, Aveiro.

Estas amostras de biomassa foram extraída e os extractos submetidos a caracterização química por cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS).

Nos pontos seguintes descrevem-se os procedimentos seguidos na amostragem e na extracção da biomassa de *E. globulus*.

A extracção com diclorometano em Soxhlet foi a metodologia usada para a obtenção dos extractos das várias fracções de casca estudadas, procedendo-se de acordo com os estudos publicados anteriormente acerca dos extractáveis do *E. globulus* [45, 47, 48, 50, 51].

A extracção das ceras cuticulares das folhas, frutos e ramagens realizou-se por imersão destes materiais em éter de petróleo/acetona a quente [70, 72, 87].

Nesta secção são ainda descritos os equipamentos e procedimentos seguidos para extracção da casca externa com CO₂ supercrítico.

2.1 Amostras de biomassa de *E. globulus*

2.1.1 Casca Industrial

A amostra de casca industrial de casca de *E. globulus*, processada pela linha de descasque, moída e seca, foi recolhida aleatoriamente na fábrica da Portucel em Cacia (figura 8).



Figura 8: Casca industrial de *E. globulus*, moída e seca, proveniente da fábrica Portucel em Cacia

2.1.2 Casca processada pela linha de descasque

O lote de amostras recolhidas para o estudo da composição em triterpenóides da casca ao longo da linha de descasque é composto por 4 tipos de casca provenientes de processamentos mecânicos sucessivos: casca do parque de madeiras (A) (sem tratamento mecânico), do pré-descascador (B), do descascador rotativo (C) e do destroçador de casca (D). Paralelamente, foram também recolhidas amostras de acumulações de resíduos de casca em dois pontos da linha de descasque, na zona do destroçador, nomeadamente, uma em cima do próprio destroçador (E) e outra no tapete de saída da casca final do destroçador (F). Na figura 9 a) é apresentado o *layout* da linha de descasque, estando assinalados os pontos de amostragem. Na figura 9 b) podem observar-se as diferentes morfologias das amostras de casca provenientes destes pontos evidenciando-se o aumento do destroçamento da casca à medida que progride na linha de descasque. A acumulação recolhida de cima do destroçador (E) não é muito diferente da restante casca

que sai do próprio destroçador (D) enquanto, comparativamente, a acumulação no tapete de saída (F) é constituída por partículas mais pequenas.

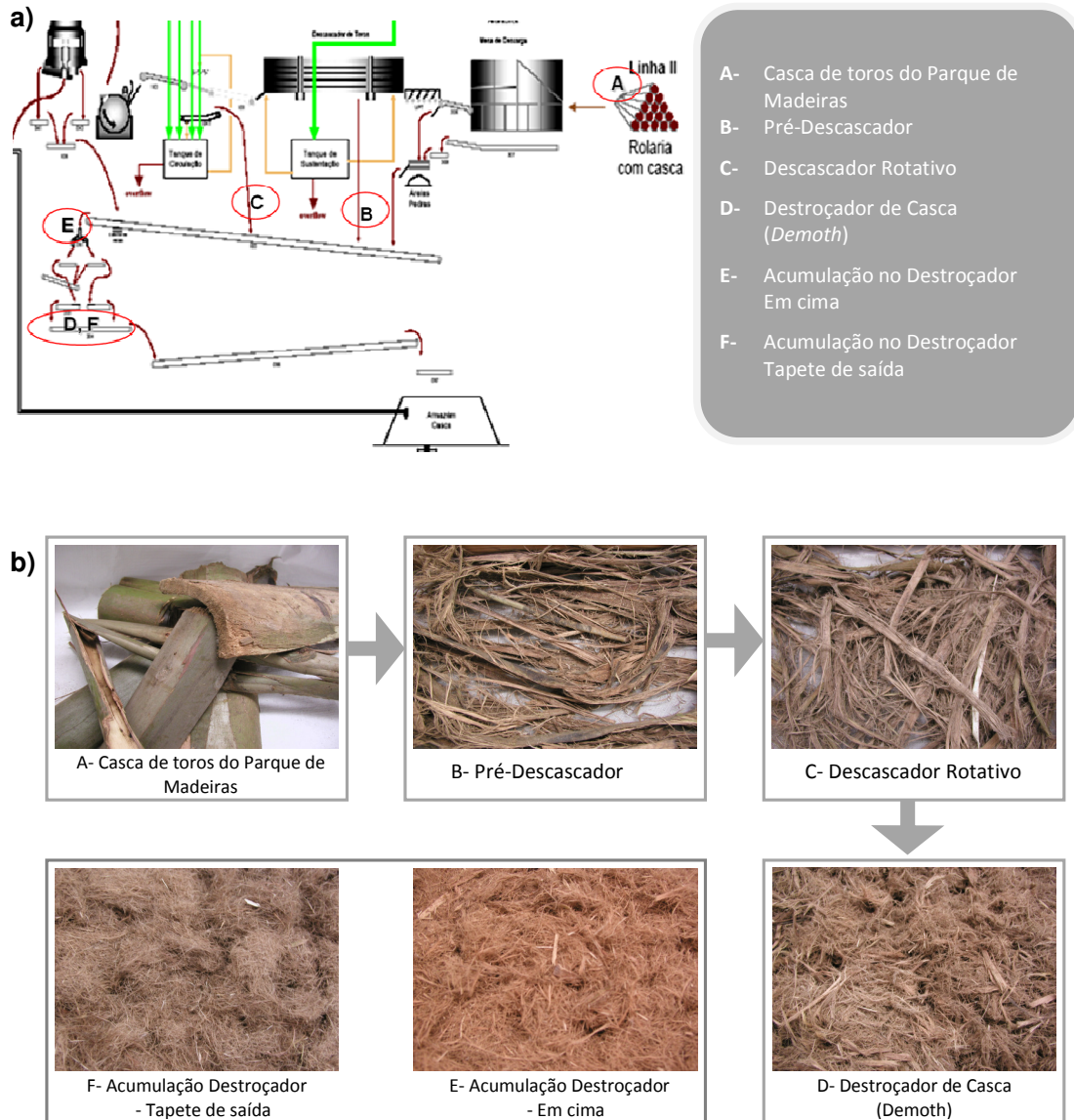


Figura 9: a) *Layout* da linha de descasque da fábrica Portucel em Cacia com indicação dos pontos de amostragem; b) Aspecto das amostras de casca proveniente dos diversos pontos de amostragem.

As amostras de casca provenientes do parque de madeiras (A), pré-descascador (B) e descascador rotativo (C), foram trituradas num moinho de lâminas de forma a adquirirem características de desintegração idênticas às da casca proveniente do destroçador (A), garantindo assim a uniformidade das condições de extracção. Todas as amostras

recolhidas ao longo dos processos de descasque e no parque de madeiras foram secas ao ar até peso constante.

2.1.3 Outras fracções de biomassa do *E. globulus*

As amostras de biomassa de *E. globulus* representativas dos resíduos resultantes da sua exploração florestal foram recolhidas de uma árvore (com 16 anos de idade, cerca de 20 m de altura e criado em segunda rotação) abatida aleatoriamente numa plantação de clones da Quinta de São Francisco em Eixo, Aveiro. Foram recolhidas amostras de folhas juvenis, folhas do topo (adultas), frutos, ramagem (figura 10). De forma a avaliar a variabilidade da composição em triterpenóides da casca total do tronco desde a base da árvore até á zona do topo, seccionou-se o tronco em secções de 1 m e recolheu-se a casca de 9 secções intercaladas (esquema da figura 11).

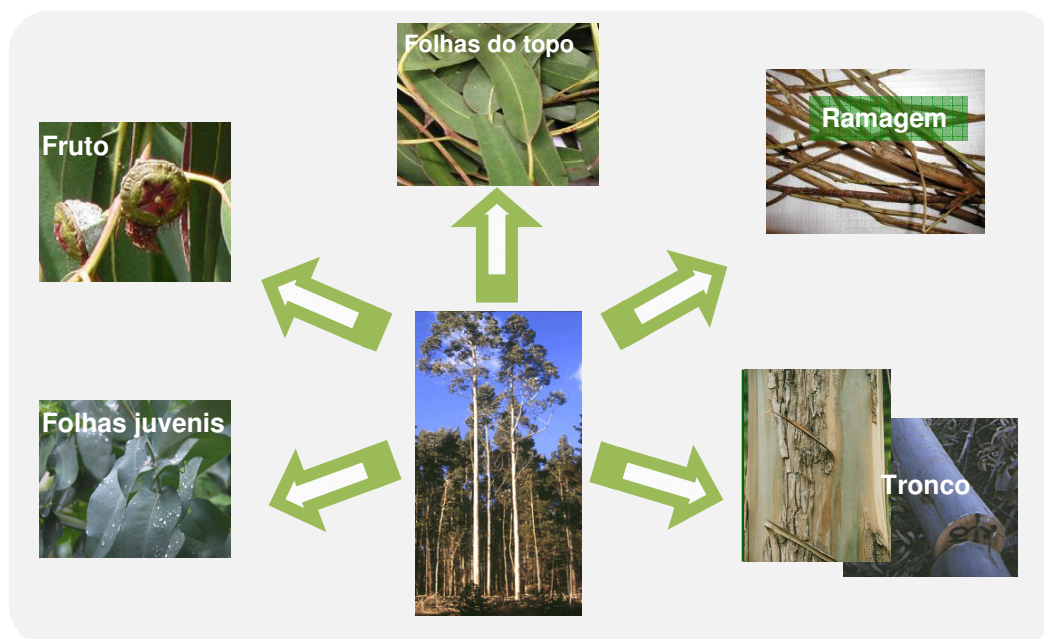


Figura 10: Amostras recolhidas para estudo da biomassa total do *E. globulus*.

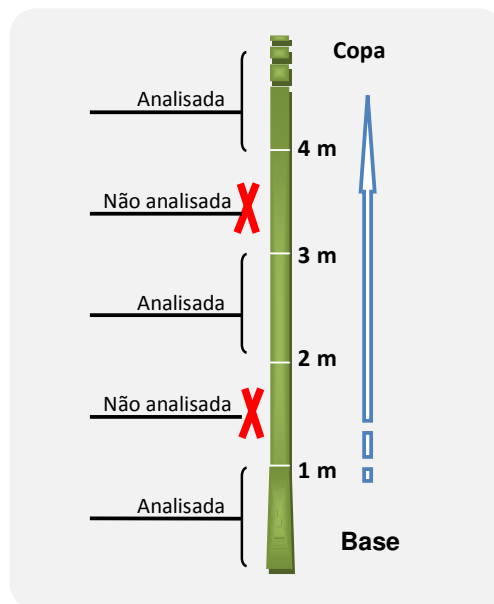


Figura 11: Esquema representativo da metodologia seguida na amostragem da casca do tronco.

As amostras de casca foram secas ao ar até peso constante e, antes da extracção, moídas em partículas inferiores a 2 mm num moinho de martelos.

As amostras de folhas juvenis, frutos e ramos e parte das folhas do topo (denominadas folhas verdes) foram submetidas de imediato ao procedimento de extracção, tal como descrito no ponto 2.2.2 e 2.2.3. As restantes folhas do topo (denominadas folhas secas) foram deixadas a secar ao ar durante 3 meses, tendo sido depois submetidas aos mesmos procedimentos de extracção referido para as respectivas folhas verdes.

Para além da casca total, foi também recolhida uma amostra da camada superficial da casca externa de todo o tronco. Esta fracção, menor que 1 mm em profundidade na casca, foi raspada ao longo do tronco no momento do abate da árvore, e deixada a secar ao ar até peso constante tal como as restantes amostras de casca.

A humidade de todas as amostras de biomassa referidas neste ponto foi determinada no momento da sua extracção.

2.2 Procedimentos de extracção das amostras de biomassa de *E. globulus*

2.2.1 Amostras de casca

Cerca de 10 a 15 g de amostra foram extraídos em Soxhlet com 300 mL de diclorometano durante 7 horas, de acordo com estudos publicados anteriormente [45, 47, 48, 50, 51]. O solvente foi evaporado, tendo-se procedido à quantificação gravimétrica dos extractos, sendo os resultados expressos em percentagem de casca seca. Este procedimento foi realizado em duplicado para todas as amostras.

2.2.2 Amostras de folhas e frutos

A extracção da cera cuticular das folhas juvenis (200 g), folhas do topo verdes (166 g) e dos frutos (61 g), foi realizada imediatamente após a sua recolha de forma a prevenir eventual reabsorção ou degradação da cera superficial [72, 87]. A extracção da cera superficial destes materiais realizou-se imergindo as amostras em éter de petróleo/acetona 1:1 (600 mL), a quente, com reduzido tempo de imersão do material no solvente (cerca de 30 s) de forma a evitar que este penetre nas folhas e nos frutos [70, 87]. Este procedimento foi repetido 5 a 6 vezes a fim de assegurar a máxima remoção da cera superficial. O solvente foi evaporado até à secura e os extractos quantificados gravimetricamente, sendo os resultados expressos em percentagem de folhas e frutos secos.

Para avaliar a eventual reabsorção ou degradação dos compostos da cera superficial das folhas, e nomeadamente dos triterpenóides, realizou-se o mesmo procedimento de extracção com as folhas do topo secas ao ar (48 g) 3 meses após a sua recolha.

2.2.3 Amostras dos ramos do topo

A extracção dos ramos do topo seguiu duas abordagens distintas:

- i) Procedimento idêntico ao usado para a extracção das folhas e frutos, usando pedaços de ramos (102 g) com cerca de 10 cm de comprimento, os quais foram imersos em éter de petróleo/acetona 1:1 (600 mL), a quente e com reduzido tempo de imersão no solvente (cerca de 30 s).
- ii) Devido á dificuldade em separa a casca dos ramos do seu material lenhoso, usou-se lixa de madeira e recolheu-se o resíduo resultante (denominado camada superficial da casca dos ramos). Cerca de 5 g do resíduo recolhido foram extraídos em soxhlet procedendo de acordo com o descrito para as amostras de casca no ponto 2.2.1.

2.2.4 Extracção da casca externa do tronco com CO₂ supercrítico

2.2.4.1 Extractor de CO₂ supercrítico

A figura 12 ilustra o sistema usado para extracção com CO₂ supercrítico e gamas de operação de algumas variáveis do processo. Este equipamento é um protótipo projectado e acoplado na Universidade de Aveiro. Neste design, o CO₂ proveniente da garrafa é comprimido por uma bomba e armazenado no acumulador até 300 bar, permitindo controlar a pressão a montante através de um sistema de válvulas. O vaso extractor de 150 mL, dentro do qual se colocam as amostras a extrair, encontra-se dentro de uma estufa onde se fixa a temperatura de extracção. O vaso é alimentado continuamente com o CO₂ proveniente do acumulador. O extracto é transportado até ao vaso de recolha onde precipita em virtude de o poder solvente do fluido diminuir com a queda de pressão nas válvulas. O CO₂ despressurizado é ventilado para a atmosfera. Dentro do vaso de recolha é colocado solvente onde borbulha o CO₂, de modo a solubilizar os compostos extraídos.

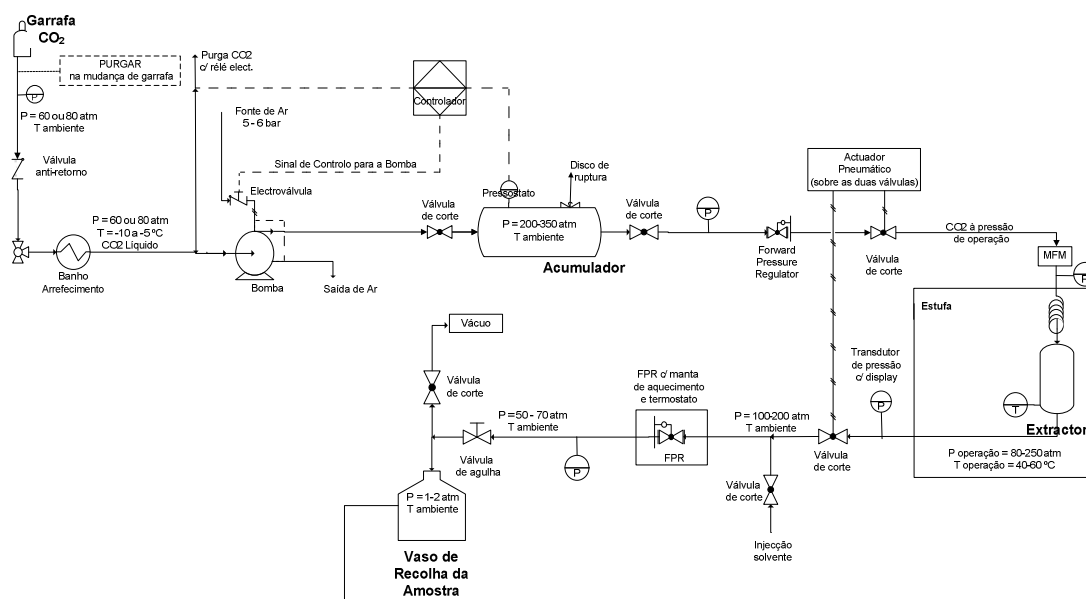


Figura 12: Diagrama esquemático do sistema de extracção com CO₂ supercrítico.

2.2.4.2 Procedimento de extracção com CO₂ supercrítico

O vaso extractor foi carregado com cerca de 30 g de amostra de casca externa do tronco de *E. globulus*. Realizaram-se duas extracções a diferentes pressões (180 e 200 bar), com um caudal médio de CO₂ de 0,50 e 0,55 kg/h, respectivamente, temperatura constante de 40 °C, durante 3 h. Ao fim de cada hora de extracção recolheram-se fracções do extracto. Estas fracções foram analisadas a fim de quantificar a extracção ao longo do tempo e avaliar o possível fraccionamento dos extractos.

2.3 Derivatizações e análises GC-MS

Antes da análise GC-MS, cerca de 20 mg de cada extracto seco foi trimetilsililado de acordo com o descrito na literatura [88]: os resíduos foram dissolvidos em 250 μL de piridina e os compostos com grupos hidroxilo e carboxilo foram convertidos em éteres e ésteres de trimetilsililo (TMS), respectivamente, por adição de 250 μL de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 μL de trimetilclorossilano (TMSCl), mantendo-se de seguida a mistura reaccional em banho de óleo a 70 °C durante 30 min.

Cada amostra foi injectada em duplicado. As análises GC-MS foram realizadas num cromatografo *Trace Gas Chromatograph 2000 Series* equipado com um espectrómetro de massa *Finnigan Trace MS* e uma coluna capilar DB1 J&W (30 m x 0,32 mm i.d., 0,25 mm de espessura de filme) nas seguintes condições cromatográficas [48]: temperatura inicial: 80 °C durante 5 min; rampa de temperaturas: 4 °C/min; temperatura final 285 °C durante 10 min; temperatura do injector: 290 °C, temperatura da linha de transferência: 290 °C; razão de *split*: 1:100. Para proceder à análise quantitativa, usou-se como padrão interno o tetracosano (99% pureza, Sigma).

Os compostos foram identificados, enquanto derivados TMS, por comparação dos seus espectros de massa com os das bases de dados espectrais de GC-MS, com dados da literatura e, em alguns casos, pela injeção de padrões.

Os dados quantitativos apresentados para cada amostra são a média dos resultados obtidos para os dois duplicados (injectados também em duplicado), quando a variação entre réplicas é inferior a 5%.

3 Resultados e Discussão

O principal objectivo desta tese é avaliar o potencial dos resíduos de biomassa do *E. globulus* para extracção de triterpenóides, em particular, ácidos triterpénicos do tipo ursano e oleanano, e a sua viabilidade a nível industrial na perspectiva da bio-refinaria integrada no sector da pasta e do papel.

Nesse sentido, é dada particular relevância à análise da biomassa processada por esta indústria com potencial para a extracção destes compostos, particularmente, as fracções que alimentam a caldeira de biomassa como a casca, folhas, ramos e frutos.

Relativamente ao processamento a nível industrial, os resíduos do *E. globulus* que alimentam a caldeira de biomassa tem duas proveniências distintas: a casca proveniente dos processamentos de descasque da madeira na fábrica, e os resíduos de biomassa em geral, provenientes das explorações florestais.

Reflectindo, de certa forma, a realidade no processamento a nível industrial, a discussão dos resultados está subdividida em dois grupos de biomassa. Por um lado, discutem-se os teores em triterpenóides na perspectiva da exploração da casca, onde se englobam as análises de casca industrial, casca de diferentes pontos na linha de descasque e amostras de casca recolhidas no parque de madeiras, discutindo-se ainda a variabilidade desses teores na casca ao longo do tronco de uma árvore e na camada superficial da casca. Por outro lado, discutem-se os teores em triterpenóides dos restantes resíduos de biomassa do *E. globulus*, nomeadamente, folhas juvenis, folhas do topo, frutos e ramos, em particular, na camada superficial da sua casca.

Considerando as crescentes pressões no sentido da indústria substituir gradualmente o uso de solventes orgânicos por solventes considerados “verdes”, e indo ao encontro do conceito de bio-refinaria, é feita ainda uma primeira abordagem ao estudo da viabilidade de extracção dos triterpenóides com CO₂ supercrítico.

A descrição e caracterização detalhada de todos os extractos não fazem parte dos principais objectivos desta dissertação. Contudo, no ponto seguinte será descrita

detalhadamente a identificação dos compostos mais abundantes de um extracto representativo, concretamente, o extracto em diclorometano da casca industrial, dando particular relevância à identificação dos triterpenóides.

3.1 identificação dos compostos lipofílicos mais abundantes nos extractos da biomassa de *E. globulus*: extracto de casca industrial

O cromatograma de GC-MS típico do extracto em diclorometano da casca industrial é apresentado na figura 13.

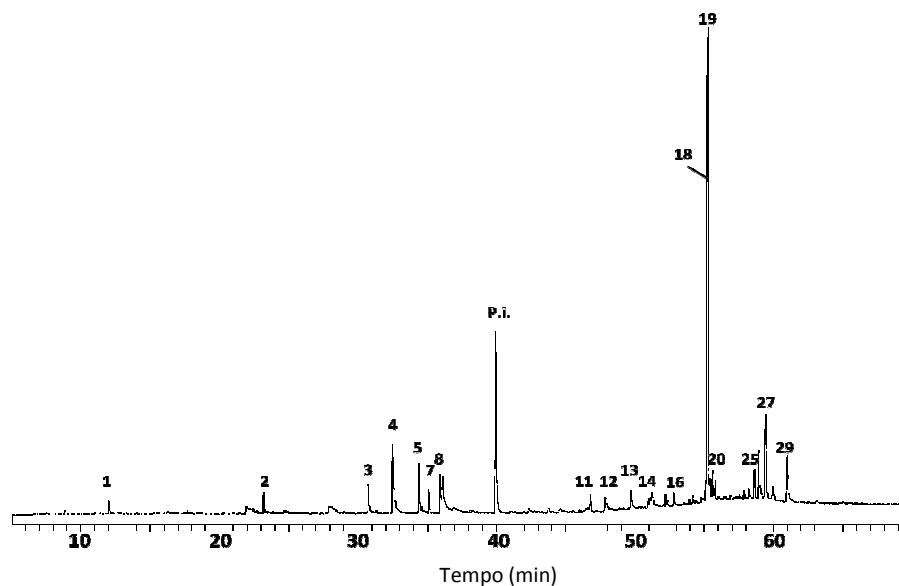


Figura 13: Cromatograma total do extracto em diclorometano da casca industrial derivativizado; A numeração refere-se à identificação dos compostos constantes na tabela 2; padrão interno (P.i.): tetracosano.

Os esteróis e os triterpenóides são os componentes maioritários deste extracto em diclorometano, sendo o β -sitosterol **19** e a β -amirina **18** os compostos mais abundantes (números referentes aos picos cromatográficos na figura 13), seguidos por quantidades relativamente mais pequenas dos ácidos ursólico **27**, 3-acetil-ursólico **29**, betulínico **26** e oleanólico **25**. Estes ácidos triterpénicos, apesar da sua relativa baixa abundância neste extracto, são componentes maioritários em algumas amostras analisadas e discutidas mais à frente neste documento. Para além destes componentes, registam-se ainda quantidades significativas de alguns ácidos gordos, especialmente ácido palmítico **4**, e alguns álcoois alifáticos de cadeia longa como o 1-hexadecanol **3**.

Os compostos acima referidos foram identificados enquanto derivados trimetilsililados (TMS) com base nos seus padrões de fragmentação [41, 45, 48, 51, 71, 72, 89-96].

Os espectros de massa dos derivados sililados de esteróis exibem, em regra, picos dos iões moleculares facilmente identificáveis ou, indirectamente, é possível obter informação acerca do seu peso molecular através da presença dos iões $[M-CH_3]^+$. O grupo TMS direcciona fortemente a fragmentação pelo que os espectros de massa dos esteróis são caracterizados pela presença abundante de fragmentos com grupos TMS [41, 48, 95]. Os fragmentos a m/z 73 $[(CH_3)_3Si]^+$ e 75 $[(CH_3)_2Si-OH]^+$ são comuns aos espectros de massa de todos os derivados TMS de esteróis e, normalmente, não fornecem informação estrutural relevante. Porém, na maioria dos casos, os fragmentos com grupos TMS fornecem informação estrutural importante. Por exemplo, os fragmentos a m/z 129 e $[M-129]^+$, correspondentes à perda do grupo TMS juntamente com um fragmento de três carbonos do anel A contendo os C-1, C-2 e C-3, favorecida pela ligação dupla β , são característicos dos 3-hidroxi- Δ^5 -esteróis [41, 94, 95]. O fragmento correspondente à eliminação do grupo trimetilsilanol $[M-90]^+$ fornece também informação estrutural relevante [94, 95]. Os fragmentos acima referidos são claramente visíveis no espectro de massa do derivado TMS do β -sitosterol **19**, apresentado na figura 14.

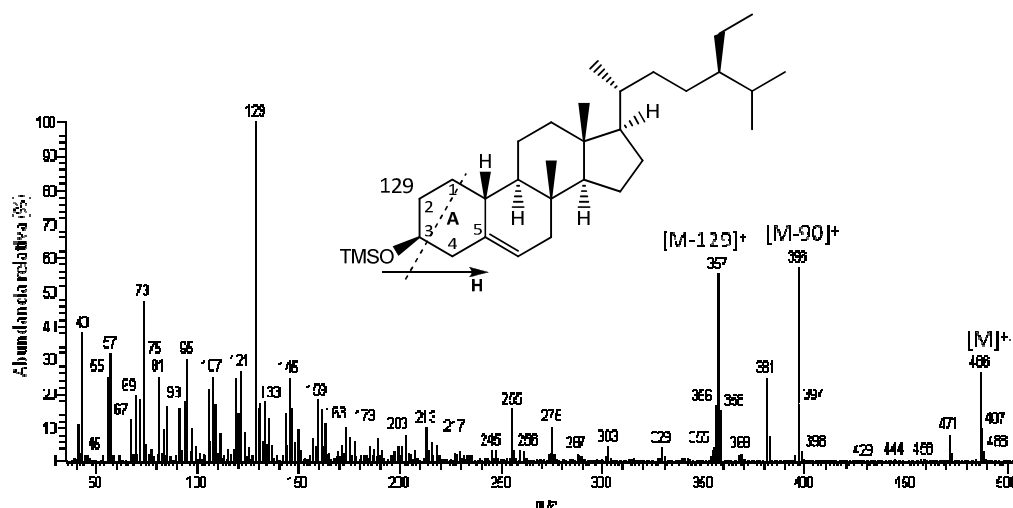


Figura 14: Espectro de massa do derivado TMS do β -sitosterol.

Os derivados TMS dos ácidos ursólico **27** e oleanólico **25** foram identificados com base nos seus padrões de fragmentação e ordem de eluição [48, 89, 92, 97]. Os sinais mais importantes são encontrados a m/z 600 $[M]^+$, 585 $[M-CH_3]^+$, 510 $[M-TMSOH]^+$, 495 $[M-TMSOH-CH_3]^+$, 482 $[M-TMSOOCH]^+$, 393 $[M-TMSOH-TMSOOC]^+$, 392 $[M-TMSOH-TMSOOCH]^+$ [48, 89, 92, 97]. A presença de uma ligação dupla $C_{12}=C_{13}$ origina uma reacção retro-Diels-Alder (rDA) resultando na formação de dois fragmentos que contém os anéis A, B e parte de C, por um lado, e os anéis D, E e uma parte de C, por outro. Os fragmentos gerados resultam nos sinais característicos a m/z 320, 307, 279, 203 e 189 representados na figura 15 [92, 97].

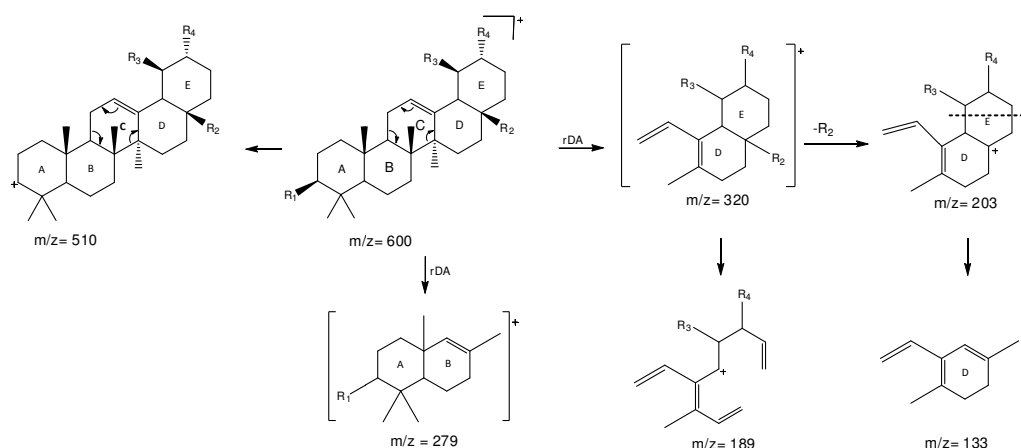


Figura 15: Principais fragmentações de derivados TMS dos triterpenóides com estrutura do tipo ursano. Valores de m/z correspondentes aos fragmentos do derivado TMS do ácido ursólico.

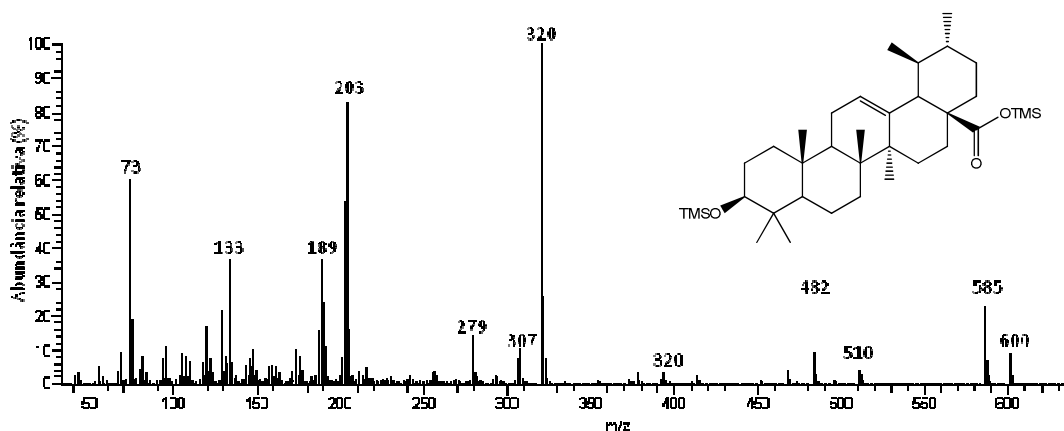


Figura 16: Espectro de massa do derivado TMS do ácido ursólico.

Os ácidos oleanólico **25** e ursólico **27** são também detectados na forma acetilada **28** e **29** (figura 17). A principal diferença entre os padrões de fragmentação dos derivados TMS acetilados e dos não acetilados encontra-se no íão molecular que surge a m/z 570 em vez de a m/z 600. Esta diferença deve-se à presença do grupo acetilo esterificado com o grupo 3-hidroxilo [98].

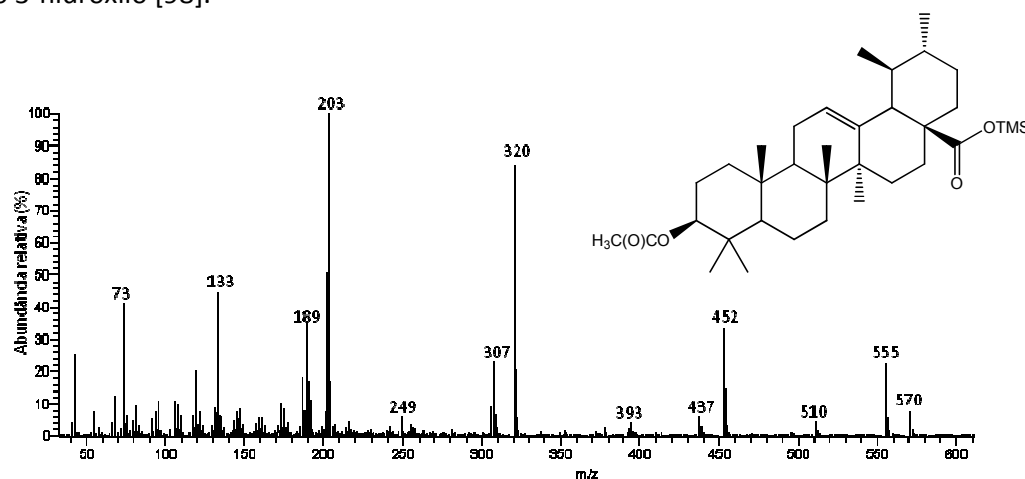


Figura 17: Espectro de massa do derivado TMS do ácido 3-acetil-ursólico.

Outros triterpenoides com estruturas do tipo oleanano detectados neste extracto são a β -amirina **18** e a α -amirina **21**. Os espectros de massa dos derivados TMS destes compostos (figura 18) são caracterizados pela presença de um sinal intenso a m/z 218, seguido por sinais a m/z 279, 203 e 189, resultante da já descrita cisão de retro-Diels-Alder ocorrida no anel C da molécula. Outros sinais relevantes são observados a m/z 498 $[M]^+$, 483 $[M-CH_3]^+$, 408 $[M-TMSOH]^+$ [92, 97].

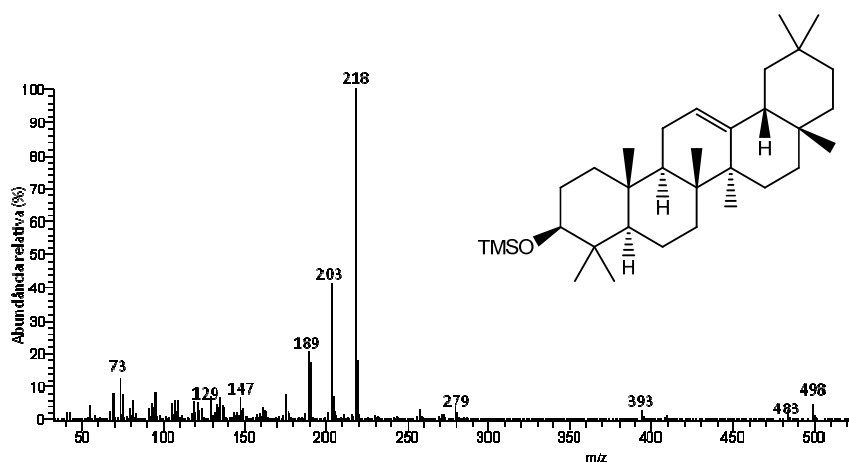


Figura 18: Espectro de massa do derivado TMS da β -amirina.

Entre os triperpenóides detectados encontram-se ainda os ácidos betulínico **26** e betulónico **23**, compostos com estrutura do tipo lupano. Ambos os espectros de massa apresentam um sinal intenso a m/z 189, característicos dos padrões de fragmentação desta família de compostos [41, 92]. À semelhança dos ursanos, o ácido betulínico **26** (figura 19) apresenta o ião molecular a m/z 600 e o fragmento a m/z 279 correspondente aos anéis A e B com o éter TMS, resultante da clivagem da ligação entre C8-C14 [99]. Outros fragmentos característicos do derivado TMS deste composto encontram-se a m/z 585 $[M-CH_3]^+$, 510 $[M-TMSOH]^+$, 482 $[M-TMSOOCH]^+$, 393 $[M-TMSOH-TMSOOC]^+$ e a 73 $[TMS]^+$ [41, 89, 92, 99].

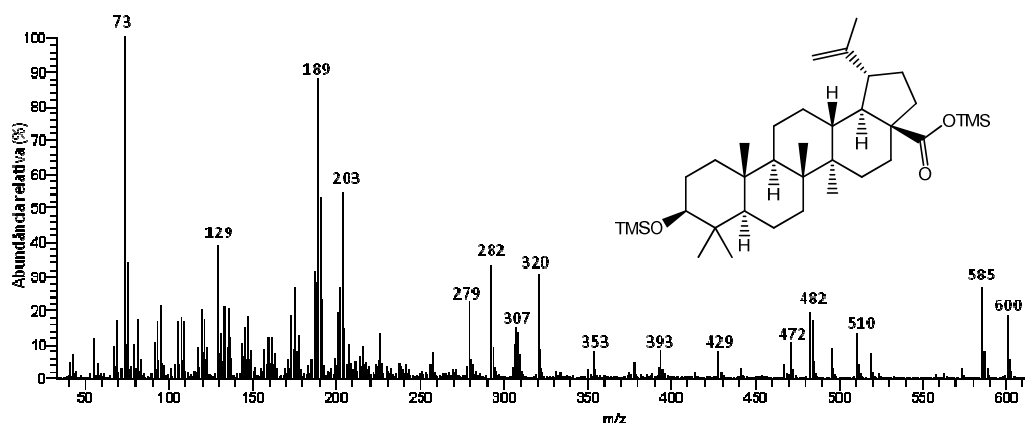


Figura 19: Espectro de massa do derivado TMS do ácido betulínico.

O espectro de massa do derivado TMS do ácido betulónico **23** (figura 20) é semelhante ao do ácido betulínico **26**, com a diferença do ião molecular aparecer a m/z 526 pelo facto de possuir um grupo carbonilo em vez de um grupo hidroxilo sililado na posição 3 [41, 92].

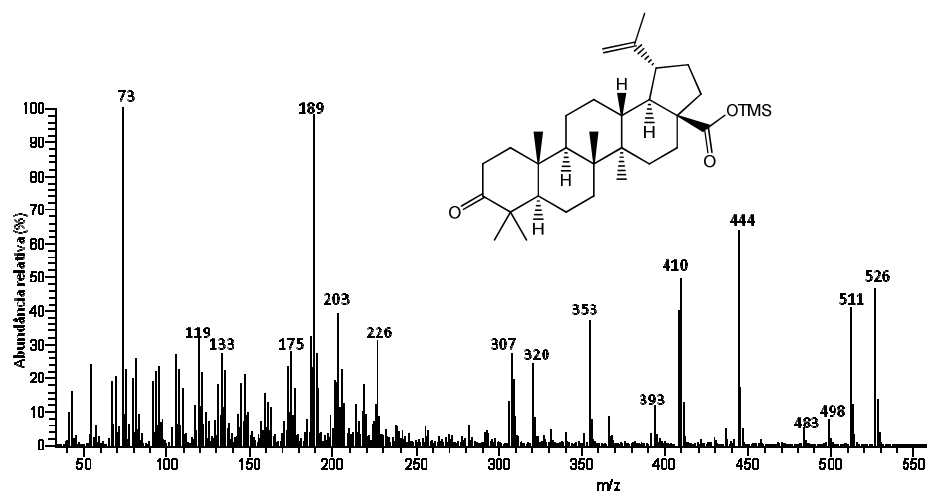


Figura 20: Espectro de massa do derivado TMS do ácido betulônico.

Os principais ácidos gordos encontrados neste extracto em diclorometano foram os ácidos palmítico **4**, linoleico **8** e oleico **9**. Os derivados TMS de ácidos gordos livres são facilmente identificáveis por GC-MS devido ao seu padrão de fragmentação típico. Os sinais dos fragmentos provenientes do grupo derivatizado a m/z 73 e 75 e do ião $[M-15]^+$ são bastante abundantes. Outros fragmentos importantes aparecem a m/z 117, 129, 132 e 145 [45, 91], como demonstrado pelo espectro de massa do derivado TMS do ácido palmítico na figura 21.

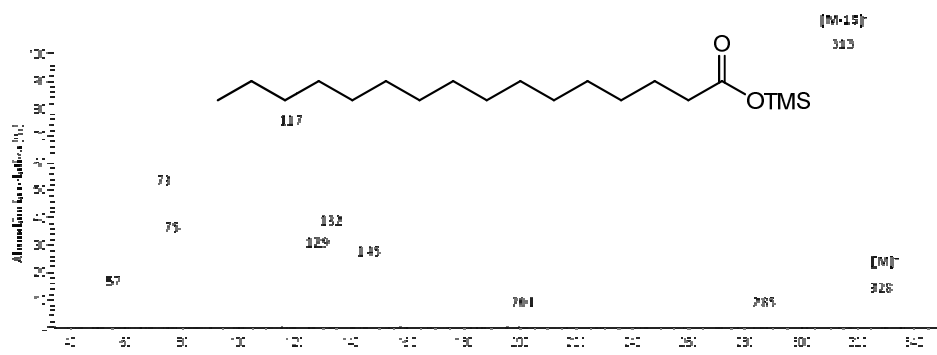


Figura 21: Espectro de massa do derivado TMS do ácido palmítico.

Os álcoois alifáticos de cadeia longa (gordos) são a família de compostos menos representativa deste extracto. Os mais abundantes são o 1-hexadecanol **3** e o 9-z-octadecen-1-ol **5**. A elevada intensidade dos sinais correspondentes aos fragmentos com m/z 75 e $[M-15]^+$ é característica destes compostos. Os espectros de massa dos derivados

TMS de álcoois gordos, normalmente, apresentam também os fragmentos com m/z 89 e 103 $[\text{TMSOCH}_2]^+$ ajudando a distingui-los dos ácidos gordos [48, 91, 100]. Na figura 22 é apresentado o espectro de massa do derivado TMS do 1-hexadecanol **3** como exemplo representativo desta família de compostos.

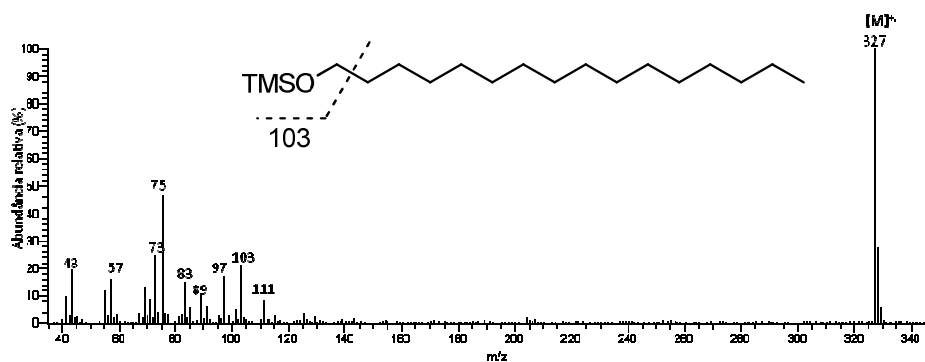


Figura 22: Espectro de massa do derivado TMS do 1-hexadecanol.

3.2 Análise do teor em triterpenóides na casca da madeira de *E. globulus*

3.2.1 Teor em triterpenóides da casca industrial

A extração em diclorometano da casca industrial proveniente da fábrica Portucel, em Cacia, obteve 0,9 % (m/m) de rendimento. A informação disponível sobre o rendimento em extractáveis da casca do *E. globulus* é escassa e refere-se individualmente às fracções morfológicas da casca interna (0,5 %) e casca externa (3,9%) [48]. Considerando a proporção mássica entre estas duas fracções 8:1 (interna/externa) [13, 48, 68], o rendimento de extração é concordante com o descrito na literatura e traduz o maior peso relativo da casca interna nos resultados.

A tabela 2 apresenta a lista de compostos detectados no referido extracto bem como a sua quantificação. Como já foi referido no ponto anterior, os esteróis e os triterpenóides são os componentes maioritários deste extracto, com predominância do β -sitosterol **19** e da β -amirina **18**, seguidos por quantidades relativamente mais pequenas dos ácidos ursólico **27**, 3-acetil-ursólico **29**, betulínico **26** e oleanólico **25**, e registando-se ainda a ocorrência de alguns ácidos gordos, especialmente ácido palmítico **4**, e álcoois alifáticos de cadeia longa como o 9-Z-octadecen-1-ol **5**.

Tabela 2: Composição do extracto em diclorometano da casca industrial de *E. globulus*, derivatizado e analisado por GC-MS; Padrão interno: tetracosano; n.i. – não identificado.

Pico	Composto	M (mg/kg)
1	Glicerol	15,7
2	n.i.	20,3
3	1-Hexadecanol	36,6
4	Ácido palmítico	125,9
5	9-Z-Octadecen-1-ol	54,2
6	9-E-Octadecen-1-ol	6,7
7	1-Octadecanol	22,0
8	Ácido linoleico	32,2
9	Ácido oleico	54,0
10	Tetracosano (P.I.)	
11	Monossacarídeo	15,6
12	Ácido tetracosanóico	23,2
13	1-Hexacosanol	16,8
14	Ácido hexacosanóico + n.i.	15,0
15	n.i.	10,6
16	1-Octacosanol	12,6
17	n.i.	6,9
18	β-Amirina	297,3
19	β-Sitosterol	400,9
20	β -Sitostanol	31,1
21	α-Amirina	36,8
22	Triterpenóide n.i.	19,2
23	Ácido betulónico	7,5
24	3β-hidroxi-urs-11-en-13β(28)-ólido + Ácido 3β,11α-di-hidroxi-urs-12-en-28-óico	7,9
25	Ácido oleanólico	34,5
26	Ácido betulínico	55,0
27	Ácido ursólico	103,9
28	Ácido 3-acetil-oleanólico	13,4
29	Ácido 3-acetil-ursólico	64,1
	Não identificados	30,9
	Triterpenóides n.i	19,2
	Total triterpenóides	639,4
	Total	1539,5

Tal como nos dados relativos ao rendimento de extracção, a composição deste extracto reflecte simultaneamente a composição referida na literatura para casca externa e interna em separado. Verifica-se a predominância dos extractáveis da fracção interna, rica em β -sitosterol **19** e β -amirina **18** e pobre em ácidos triterpénicos, compostos muito abundantes na casca externa [48].

Relativamente às abundâncias dos componentes por kg de casca, observaram-se valores inferiores aos publicados para esta espécie, particularmente no que diz respeito os ácidos triterpénicos [48]. Considerando a proporção mássica casca interna/externa 8:1 referida acima, os triterpenóides deveriam apresentar valores na ordem dos 3 g/kg de casca total [48]. Porém, nas amostras estudadas, esta família de compostos representa apenas 639 mg/kg do extracto em diclorometano (figura 23).

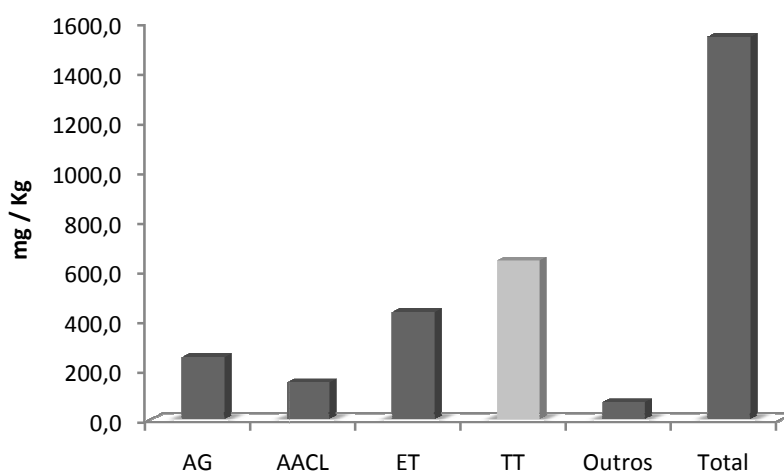


Figura 23: Abundância das principais famílias de compostos (AG - Ácidos gordos, AACL - Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa, TT - Triterpenóides) identificados no extracto da casca industrial de *E. globulus* em diclorometano.

Considerando que os ácidos triterpénicos estão predominantemente concentrados na casca externa [48] de *E. globulus*, o baixo teor de compostos triterpénicos detectados poderá, à partida, estar relacionado com a variabilidade natural da matéria-prima, ou com o efeito do processamento mecânico de descasque que poderá remover a fracção superficial da casca, mais rica nestes compostos.

A fim de confirmar a origem das diferenças observadas face aos dados da literatura [48] procedeu-se, como se descreve nos parágrafos seguintes, à análise de amostras da casca total do tronco e da sua camada superficial.

3.2.2 Teor em triterpenóides da casca total do tronco de *E. globulus*

No sentido de verificar se as diferenças observadas entre os teores em triterpenóides observados na casca industrial e os respectivos teores publicados para a casca de *E. globulus* [48] poderiam estar relacionado com a variabilidade natural da matéria-prima, analisaram-se amostras da casca total recolhidas de uma árvore abatida na plantação de clones de *E. globulus* da quinta de São Francisco, em Eixo, Aveiro.

A extracção em diclorometano da casca total revelou um rendimento de 0,9 % (m/m), concordante com o descrito na literatura [48], considerando a proporção mássica entre as duas fracções de casca (interna/externa) 8:1 [13, 68].

No que diz respeito à composição do extracto, verificou-se que do ponto de vista qualitativo, efectivamente, os triterpenóides são a família de compostos mais abundantes, com predominância dos ácidos ursólico (934 mg/kg), 3-acetil-ursólico (724 mg/kg), oleanólico (363 mg/kg), 3-acetil-oleanólico (179 mg/kg) e betulínico (284 mg/kg), e da β -amirina (255 mg/kg), registando-se ainda teores significativos em β -sitosterol (478 mg/kg). Considerando a proporção mássica entre casca interna/casca externa [13] acima referida, e relacionando-a com uma composição em triterpenóides da casca externa da ordem de 25 g/kg [48], seria de esperar que o teor em triterpenóides da casca total se encontrasse entre os 3 a 4 g/kg, o que efectivamente se verifica, situando-se nos 3,8 g/kg num total de 5,2 g/kg de compostos quantificados (figura 24).

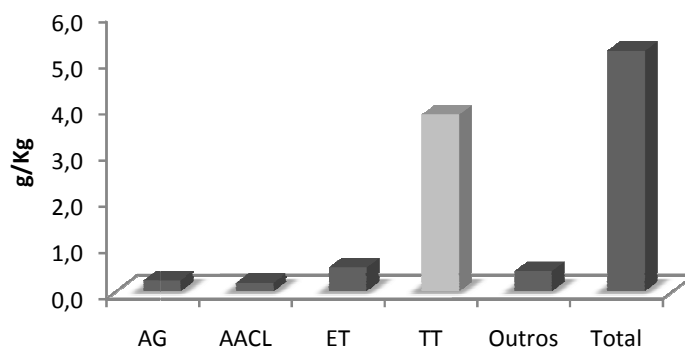


Figura 24: Quantificação das principais famílias de compostos (AG - Ácidos gordos, AACL - Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa, TT - Triterpenóides) identificados no extracto da casca total do tronco de *E. globulus* em diclorometano.

Estes resultados indicam que a variabilidade natural da matéria-prima não justifica os baixos teores em triterpenóides da casca industrial. As diferenças observadas poderão, por isso, estar relacionadas com os posteriores armazenamentos da madeira no parque de madeiras ou com os processamentos mecânicos da casca na linha de descasque.

Sendo a camada superficial da casca externa a fracção mais exposta aos processamentos mecânicos aplicados sobre os toros de madeira na linha de descasque e, também por isso, a mais susceptível a possíveis remoções, era importante estudar a sua composição no sentido de averiguar em que medida a sua possível remoção afecta o teor de triterpenóides da casca total.

Nesse sentido, descreve-se nos parágrafos seguintes o estudo da composição em triterpenóides da camada superficial da casca externa do tronco.

3.2.3 Teor em triterpenóides da camada superficial da casca do tronco

O rendimento de extracção da camada superficial da casca do tronco foi de 5,2%, superior aos rendimentos típicos para amostras de casca externa total (3,9%) [48].

Como já foi referido, a casca externa do tronco de *E. globulus* é rica em triterpenóides, particularmente em ácidos triterpénicos, compostos que não se encontram na fracção interna da casca [48]. Tal como na casca externa total, verificou-se que o extracto da sua camada superficial é rico em ácidos triterpénicos com predominância dos ácidos ursólico e o seu derivado acetilado 3-acetil-ursólico, representando, respectivamente, 7,8 g/kg e 6,9 g/kg num total quantificado de 35,9 g/kg. Somados, estes dois compostos constituem 41% do total quantificado. Os ácidos oleanólico (4,1 g/kg), betulínico (4,2 g/kg), betulónico (2,1 g/kg), e 3-acetil-oleanólico (2,3 g/kg), são igualmente abundantes neste extracto.

Na figura 26 resume-se a composição do extracto da camada superficial acima referida. Pode verificar-se que os triterpenóides são a família de compostos mais abundante, representando 31,5 g/kg da camada superficial da casca do tronco, teor superior ao referido na literatura para a casca externa total (25 g/kg) [48].

A elevada abundância dos triterpenóides e em particular dos ácidos triterpénicos na camada superficial da casca externa, confirmam que estes compostos estão essencialmente concentrados nesta fracção de casca e, por isso, são susceptíveis a remoção involuntária durante os processamentos de descasque. Esta particularidade pode ter especial relevância na justificação dos baixos teores em triterpenóides observados na casca industrial. Para além disso, a elevada concentração destes compostos na camada superficial do tronco pode ser importante na concepção e desenvolvimento de futuros processos da sua extração.

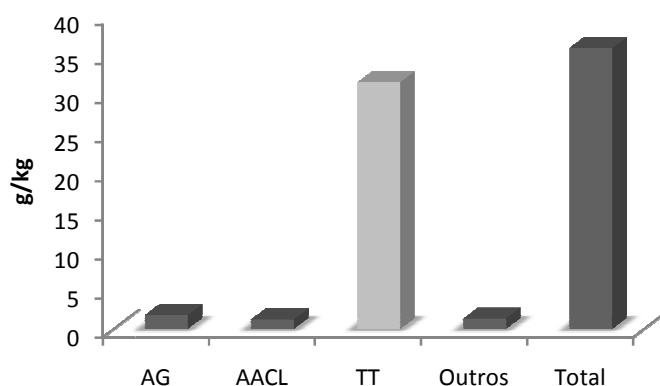


Figura 25: Quantificação das principais famílias de compostos (AG - Ácidos gordos, AACL - Álcoois alifáticos de cadeia longa, TT - Triterpenóides) identificados no extracto em diclorometano da camada superficial da casca do tronco de *E. globulus*.

A fim de confirmar o pressuposto anteriormente referido de os baixos teores em triterpenóides observados na casca industrial estarem relacionados com o armazenamento da madeira no parque de madeiras ou com os processamentos mecânicos da casca na linha de descasque, procedeu-se à análise de amostras da casca total do tronco provenientes do parque de madeiras, bem como à avaliação da composição de diferentes amostras de casca recolhidas ao longo do processo de descasque.

3.2.4 Teor em triterpenóides da casca do parque de madeiras

De acordo com os dados publicados [101], a madeira de *E. globulus* exhibe, durante o seu armazenamento, uma variação considerável nos teores e na composição dos extractáveis lipofílicos. No sentido de verificar se as diferenças observadas entre os teores em triterpenóides observados na casca industrial e os respectivos teores publicados para a casca de *E. globulus* [48] poderiam também estar relacionado com o seu armazenamento, analisaram-se amostras de casca recolhida da madeira do parque de madeiras da fábrica Portucel, em Cacia.

A extracção em diclorometano da casca total exibiu um rendimento de 0,7 % (m/m), menor que o rendimento de extracção casca total da árvore abatida na plantação de clones (0,9%), mas dentro do gama de valores esperados [48] considerando a proporção entre casca interna/casca externa referida anteriormente [13].

No que diz respeito à composição do extracto, verificou-se que, do ponto de vista qualitativo e quantitativo, não se observam grandes diferenças relativamente à composição do extracto da casca total da árvore abatida na plantação. Os triterpenóides são a família de compostos mais abundantes, com predominância dos ácidos ursólico (670 mg/kg), 3-acetil-ursólico (566 mg/kg), oleanólico (201 mg/Kg), 3-acetil-oleanólico (225 mg/kg) e betulínico (169 mg/kg), e da β -amirina (660 mg/kg), registando-se ainda teores significativos em β -sitosterol (671 mg/kg).

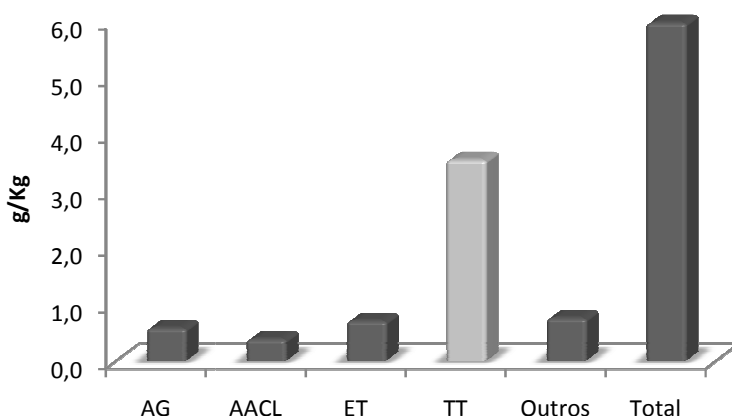


Figura 26: Quantificação das principais famílias de compostos (AG - Ácidos gordos, AACL - Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa, TT - Triterpenóides) identificados no extracto da casca de *E. globulus* do parque de madeiras em diclorometano.

O teor total em triterpenóides na casca proveniente do parque de madeiras situa-se nos 3,6 g/kg num total de 6,0 g/kg de compostos quantificados (figura 26), valores similares aos registados na casca total da árvore da plantação (3,8 em 5,2 g/Kg, respectivamente).

Estes resultados indicam que os teores em triterpenóides da casca de *E. globulus* armazenado no parque de madeiras não exibem variações significativas relativamente aos respectivos teores na casca de *E. globulus* das plantações, não justificando, por isso, os baixos teores em triterpenóides da casca industrial. As diferenças observadas poderão então estar relacionadas com os posteriores processamentos mecânicos da casca na linha de descasque.

De forma a verificar se estes processamentos mecânicos, que poderão remover a fracção superficial da casca, mais rica em triterpenóides, serão os responsáveis pelas diferenças observadas nos teores destes compostos na casca industrial, procedeu-se de seguida à análise de amostras de casca recolhidas ao longo do processo de descasque.

3.2.5 Teor em triterpenóides da casca ao longo da linha de descasque

Os rendimentos de extracção das amostras de cascas provenientes das várias etapas do processo de descasque (B, C e D) variam entre 0,6% e 0,7%, rendimentos típicos para amostras de casca onde predomina a fracção interna deste material [48]. Quanto às acumulações de resíduos de casca recolhidos (E e F) destaca-se claramente a acumulação no tapete de saída do destroçador (F) que apresenta rendimentos de extracção da ordem de 1,5%, cerca do dobro dos valores obtidos nas amostras recolhidas do parque de madeiras (A). Esta evidência indica-nos que o material acumulado é, maioritariamente constituído por uma fracção de casca rica em extractáveis solúveis em diclorometano (casca externa), um sinal de que parte desta secção da casca se solta com maior facilidade do material conduzido pela linha de descasque.

Na figura 27 apresenta-se o teor de triterpenóides e o total de extractáveis quantificados nos extractos das amostras de casca provenientes das várias etapas do processo de descasque. Pode observar-se uma clara tendência decrescente quer do teor

em triterpenóides, quer do total de extractáveis quantificados ao longo do processo de descasque. Considerando os elevados teores em triterpenóides observados na camada superficial da casca (31,5 g/kg) comparativamente com os respectivos teores na casca total recolhida no parque de madeiras (3,6 g/kg), este decréscimo faz supor a remoção da fracção superficial da casca externa, conforme se confirma também pela sua acumulação (F). Pode observar-se que a acumulação no tapete de saída do destrojador (F) apresenta teores de triterpenóides superiores aos da casca do parque de madeiras, ou seja, 4,4 g/kg num total de 8,1 g/kg de compostos quantificados. Contudo, refira-se que esta acumulação não será muito representativa em termos de balanço total de massa de casca que passa pela linha de descasque, não podendo, portanto, ser vista como um ponto relevante para o potencial aproveitamento deste tipo de compostos.

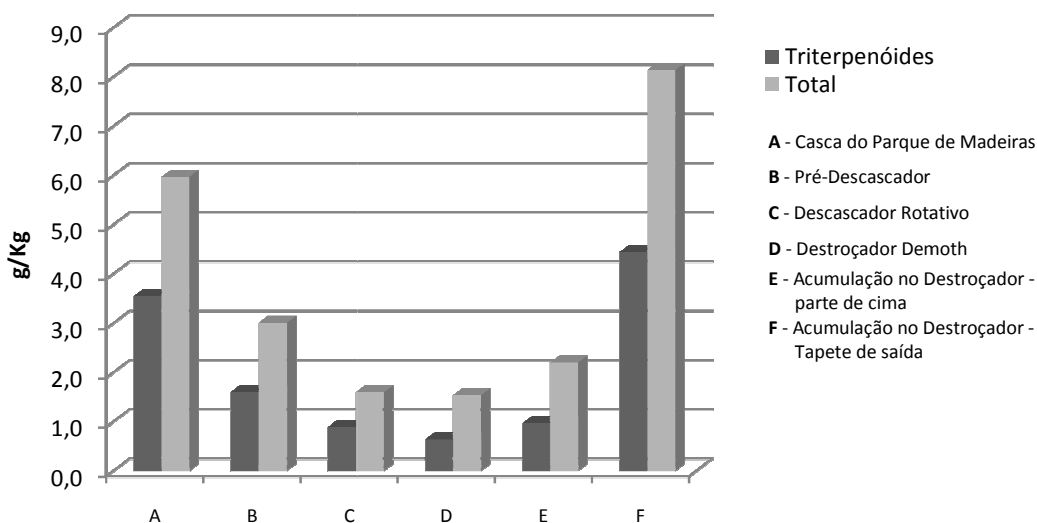


Figura 27: Teor em triterpenóides (g/kg) dos extractos em diclorometano das cascas e acumulações provenientes do processo de descasque.

Após passagem pelo pré-descador (B), o teor em triterpenóides da casca reduz-se para 1,6 g/kg, representando a perda de cerca de 56% relativamente aos teores da casca do parque de madeiras (A), 3,6 g/kg. Estas perdas mantêm-se nas etapas seguintes, sendo de cerca de 19% no descascador rotativo (C) e 8% no destrojador de casca (D), acabando a casca final por apresentar apenas 0,6 g/kg de triterpenóides. No total, a casca perde cerca de 82% do seu teor em triterpenóides durante o processo de descasque.

Estes resultados demonstram que os processos de descasque assumem particular relevância no respeitante à remoção da fracção superficial da casca externa, rica em triterpenóides e mais susceptível à remoção mecânica, apresentando-se o pré-descasque como a etapa mais agressiva na degradação da casca.

É importante referir que os poucos pontos de acesso à linha em pleno funcionamento limitaram a extensão deste estudo, nomeadamente no referente a outros possíveis pontos de acumulações dentro da maquinaria, como o pré-descascador ou o descascador rotativo, e que poderiam constituir pontos relevantes para a recolha de amostras representativas da fracção mais rica em compostos triterpénicos, permitindo desenvolver processos de extracção mais eficientes.

3.3 Análise do teor em triterpenóides dos resíduos florestais de *E. globulus*

Após a caracterização da casca de *E. globulus* relativamente ao seu teor em triterpenóides, apontou-se como um dos objectivos deste trabalho a avaliação da viabilidade da extracção destes compostos a partir de outras partes morfológicas da árvore *E. globulus* no sentido da valorização industrial destes resíduos florestais.

Actualmente, elevadas quantidades de biomassa de *E. globulus*, tais como os topos das árvores (folhas, ramagem e frutos) resultantes do seu abate, têm como destino final a queima nas caldeiras de biomassa para a produção de energia eléctrica ou são deixadas nas próprias plantações. Estima-se que a quantidade total de resíduos resultantes dos topos seja cerca de 15 kg/árvore, considerado a humidade destes resíduos de 52.6% e um tempo de rotação médio de 10 anos, ao fim do qual as árvores atingem um diâmetro à altura do peito (DAP) de 12.5 cm [102, 103]. O sector da pasta e do papel em Portugal consumiu em 2006 cerca de $4,8 \times 10^7$ m³ de madeira de eucalipto (principalmente *E. globulus*) [12], as quais podem originar anualmente cerca de $5,0 \times 10^6$ ton secas destes resíduos (considerando a sua humidade média 52.6% como referido anteriormente)[102]. A estes resíduos, acrescenta-se ainda a biomassa não contabilizada resultante das podas entre rotações de árvores, principalmente folhas juvenis.

As potenciais mais-valias resultantes da extracção de compostos com elevado valor comercial a partir destes resíduos antes da sua alimentação à caldeira de biomassa, enquadram-se perfeitamente no âmbito deste estudo e seriam mais um contributo para a implementação do conceito de bio-refinaria na indústria papeleira.

Nesse sentido, será discutida nesta secção a análise do teor em triterpenóides das fracções de biomassa de *E. globulus* resultantes da exploração florestal, nomeadamente, folhas juvenis, folhas do topo, frutos e ramos.

A fim de verificar se existe uma tendência na distribuição dos triterpenóides na árvore de *E. globulus*, será ainda discutida a variação dos teores destes compostos na casca ao longo do tronco.

3.3.1 Teor em triterpenóides da cera cuticular das folhas de *E. globulus*

No estudo da composição das ceras cuticulares de uma variedade de plantas detectaram-se triterpenóides de diferentes tipos [72, 104-106]. As referidas ceras foram obtidas através da breve imersão do material a extrair em solventes orgânicos a quente, com o propósito de dissolver apenas seu revestimento ceroso [72, 104-106]. O procedimento de extracção descrito por estes autores foi adoptado para o estudo dos teores em triterpenóides nas ceras cuticulares das folhas de *E. globulus*.

Os rendimentos de extracção por imersão em éter de petróleo/acetona 1:1 da cera cuticular das folhas juvenis apresentam valores idênticos aos das folhas do topo verdes, 0,7% e 0,8% respectivamente, encontrando-se dentro da gama de valores referidos na literatura para estas fracções de biomassa do *E. globulus*, obtidos por metodologias semelhantes [72]. Com o propósito de avaliar a possível degradação ou reabsorção dos triterpenóides em tempo útil de processamento industrial, as folhas do topo foram ainda analisadas três meses após a sua recolha (denominadas folhas do topo secas)[72, 87, 105, 107]. Nas folhas do topo secas, estes valores duplicam, obtendo-se rendimentos de extracção de cerca de 1,8%.

O cromatograma de GC-MS típico do extracto em éter de petróleo/acetona 1:1 da cera cuticular das folhas juvenis está ilustrado na figura 28, apresentando-se na tabela 3 a lista de compostos detectados nas várias amostras de folhas analisadas bem como a sua quantificação.

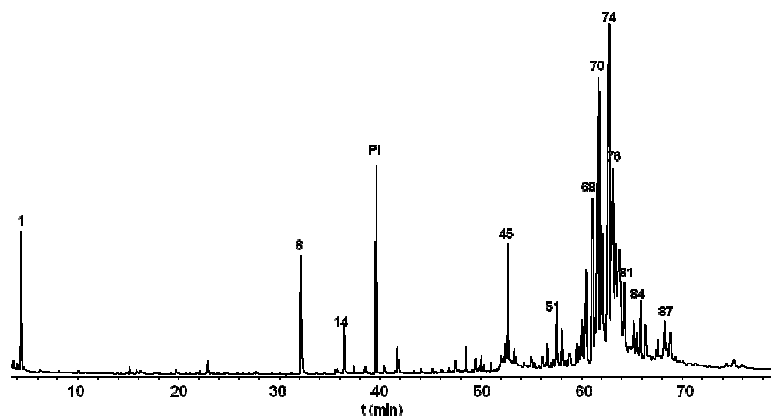


Figura 28: Cromatograma total do extracto em éter de petróleo/acetona 1:1 da cera cuticular das folhas juvenis derivatizado; A numeração refere-se à identificação dos compostos constantes na tabela 1; Padrão interno (PI): tetracosano.

Tabela 4: Composição do extracto das folhas juvenis, folhas do topo verdes e folhas do topo secas de *E. globulus* em éter de petróleo/acetona 1:1, derivatizado e analisado por GC-MS; Padrão interno: tetracosano; n.i. – não identificado.

Pico	Composto	M (mg/kg)		
		Folhas juvenis	Folhas do topo verdes	Folhas do topo secas
1	Ácido hexanóico	192,9		
3	Glicerol		21,9	9,4
4	Cariofileno	13,5	9,5	
5	Aromadendreno	9,4		
6	α -cariofileno	7,5	6,1	
7	Álcool sesquiterpénico n.i.	21,0	11,6	
8	Álcool sesquiterpénico n.i.			9,8
10	Ácido tetradecanóico	7,9	14,4	
11	Fructose			7,9
14	Ácido palmítico	253,5	97,0	16,6
15	Ácido linoleico	9,4		
16	Ácido oleico	51,6	32,9	
17	Isómero do ácido oleico		32,9	
18	Ácido octadecanóico	51,0	65,5	
23	Ácido eicosanóico	20,3	11,9	
24	Alcano			45,0
25	Alcano		19,6	4,6
26	Ácido docosanóico	11,6	18,6	4,6
27	Alcano		108,9	83,0
28	1-Tetracosanol		38,3	17,1
29	Alcano	7,0	18,3	
31	Alcano			5,4
32	Ácido tetracosanóico	21,7	35,4	13,3
33	1-Pentacosanol		10,8	6,6
34	Alcano	44,6	114,4	85,9
35	Ácido pentacosanóico		11,5	
36	1-Hexacosanol		142,2	105,4
39	Alcano	11,0		
40	Ácido hexacosanóico	15,1	52,3	34,4
41	1-Heptacosanol		11,6	11,9
43	Alcano	29,8		
45	α -Tocoferol (vitamina E) + ácido heptacosanóico	322,9	87,9	85,5
47	1-Octacosanol	31,6	221,7	173,3
50	Ácido octacosanóico + n.i.	25,9	71,3	35,4
51	1-Nonacosanol	14,3	27,0	16,5
53	β -Sitosterol + β -amirina	63,5	96,6	76,0
55	α -Amirina	12,5	21,3	15,1
56	1-Triacontanol	161,3	264,0	151,5
59	Triterpenóide n.i.			5,5
62	Ácido triacontanóico	47,4	56,5	17,2
65	Triterpenóide n.i.	115,9	83,7	81,5
66	Triterpenóide n.i.	55,3	54,3	33,4
67	Ácido betulónico	286,9	189,2	153,0
68	3 β -hidroxi-urs-11-en-13 β (28)-olido	596,6	499,2	706,6
70	Ácido oleanólico	1137,4	796,5	895,8
71	Ácido betulínico	505,2	189,0	164,4
72	Triterpenóide n.i.		119,7	228,1
74	Ácido ursólico	1573,7	2022,6	2360,2
79	Tritriacontan-16,18-diona + triterpenoide n.i.		126,6	
81	Ácido 3-acetil-ursólico	328,6	166,3	44,2
82-87	Triterpenóide n.i.	541,8	734,5	356,4
	Triterpenóides n.i.	713,0	937,9	753,3
	Não identificados	3584,5	2098,6	1089,0
	Total triterpenóides	4001,9	4801,0	5077,3
	Total	10315,6	8966,1	7197,7

Na figura 29 resumem-se os resultados da quantificação dos diversos grupos de componentes dos extractos das ceras cuticulares das folhas analisadas. Pode observar-se que a família dos triterpenóides é, em geral, a mais abundante, variando entre 4,0 e 5,1 g/kg de folhas num total quantificado entre 7,2 e 10,3 g/kg. Esta família de compostos representa entre 31% na cera das folhas do topo secas e 38% na cera das folhas do topo verdes.

Atendendo a este resultados, verifica-se que as folhas de *E. globulus* são também um dos resíduos de biomassa com potencial para a exploração de triterpenóides.

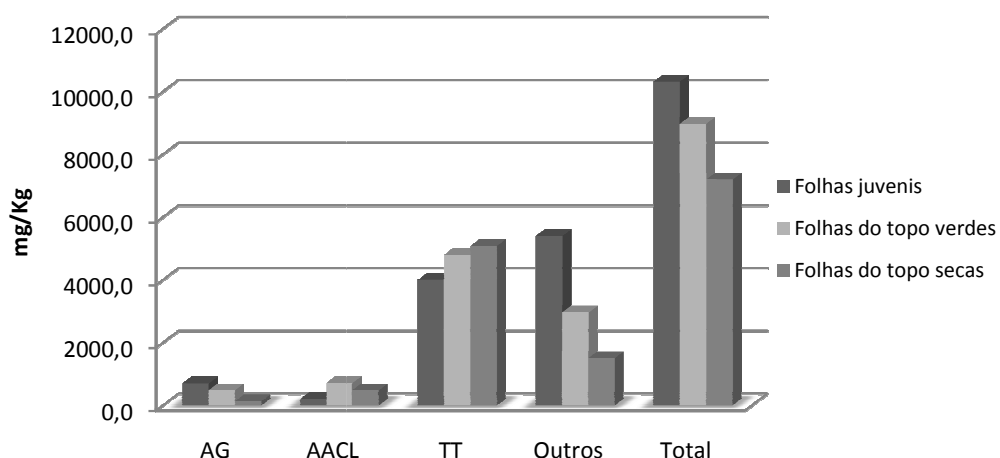


Figura 29: Teores das principais famílias de compostos (AG - Ácidos gordos, AACL - Álcoois alifáticos de cadeia longa, TT - Triterpenóides) identificados no extracto das folhas juvenis, folhas do topo verdes e folhas do topo secas de *E. globulus* em éter de petróleo/acetona 1:1.

Analisando cada caso em particular, observa-se que a cera cuticular das folhas juvenis revelou uma abundância considerável de ácidos triterpénicos, com clara predominância dos ácidos ursólico **74**, (1,6 g/kg), e oleanólico **70**, (1,1 g/kg). Entre os compostos mais abundantes destacam-se ainda alguns triterpenóides não identificados (**82-87**) que representam um total de 0,7 g/kg.

A composição da cera das folhas do topo verdes é semelhante ao das folhas juvenis mas com maior abundância em triterpenóides. A cera é constituída maioritariamente por ácidos triterpénicos, com clara predominância dos ácidos ursólico **74** e oleanólico **70** e, comparativamente com as folhas juvenis, as folhas do topo são mais ricas em ácido ursólico **74**, (2,0 g/kg), e menos em ácido oleanólico **70**, (0,8 g/kg). Entre os compostos

mais abundantes, encontram-se igualmente alguns triterpenóides não identificados (0,77 g/kg).

O extracto da cera das folhas do topo secas revelou composição similar ao das respectivas folhas verdes. O extracto analisável é constituído maioritariamente por ácidos triterpénicos, com clara predominância dos ácidos ursólico **74**, (2,4 g/kg), e oleanólico **70**, (0,9 g/kg). Comparativamente com as folhas verdes, não se registaram alterações significativas nos valores da composição em ácidos triterpénicos, observando-se, inclusivamente, um ligeiro aumento nas quantidades extraídas destes compostos. Assim como nos extractos das ceras das folhas juvenis e folhas do topo verdes, entre os compostos mais abundantes, constam alguns triterpenóides não identificados (principalmente **72** e **86**) que representam um total de 0,75 g/kg.

Todos os triterpenóides identificados nas ceras das três amostras de folhas analisadas foram detectados em outras fracções de biomassa de *E. globulus*, nomeadamente nos extractáveis da casca externa [48] e nas ceras cuticulares das pseudocápsulas (frutos) [70]. A sua presença foi ainda registada nas folhas de *E. camadulensis* [108] e *E. hybrid* [109]. No entanto, outros estudos realizados sobre várias espécies deste género, e no caso do *E. globulus* em particular, indicam a reduzida abundância [72] ou mesmo a total ausência de triterpenóides na composição das ceras cuticulares das folhas [105, 110], contrariamente ao que observamos nas amostras analisadas.

Para além dos referidos componentes, as ceras das folhas apresentam ainda pequenas quantidades de sesquiterpenos e álcoois sesquiterpénicos, componentes abundantes no óleo essencial das folhas de *E. globulus* [111, 112]. Alguns destes compostos têm um considerável valor comercial e podem ser extraídos em maior quantidade usando outros métodos de extracção mais adequados [111-113]. A não identificação inequívoca dos álcoois sesquiterpénicos deve-se ao facto de eles se encontrarem na forma de derivados sililados devido ao método de análise usado. A informação sobre estes compostos nesta forma é escassa já que, por norma, eles são analisados na forma livre [111-113].

3.3.2 Teor em triterpenóides da cera cuticular dos frutos de *E. globulus*

O rendimento de extracção por imersão em éter de petróleo/acetona da cera cuticular dos frutos foi 0,2%, encontrando-se de acordo com os valores referidos na literatura para ceras destas fracções de biomassa de *E. globulus* obtidas por metodologias semelhantes [70].

O extracto da cera cuticular dos frutos de *E. globulus* é maioritariamente constituído por ácidos triterpénicos, com predominância do ácido ursólico (0,5 g/kg), seguido pelos ácidos oleanólico e betulínico (0,16 e 0,18 g/kg respectivamente) num total de 1,7 g/kg de compostos quantificados. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura sobre a constituição das ceras dos frutos de *E. globulus* [70].

À semelhança do que acontece na cera das folhas, destaca-se também a presença de pequenas quantidades de sesquiterpenos e álcoois sesquiterpénicos, principais componentes do óleo dos frutos de eucalipto [70, 113] que podem ser extraídos em maior quantidade usando outros métodos de extracção mais adequados [113], e diversos triterpenóides não identificados (0,17 g/kg).

Na figura 30 resumem-se os resultados da quantificação dos diversos grupos de componentes dos extractos da cera cuticular dos frutos.

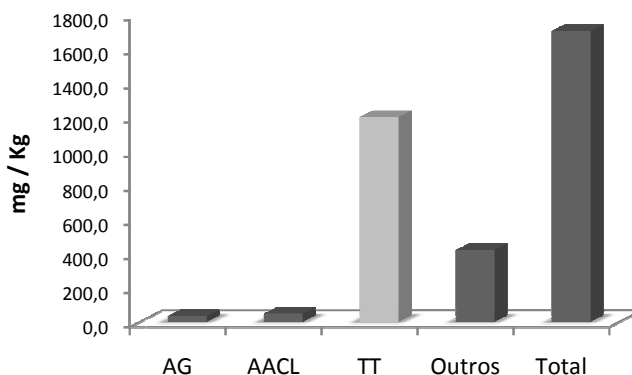


Figura 30: Quantificação das principais famílias de compostos (AG - Ácidos gordos, AACL - Álcoois alifáticos de cadeia longa, TT - Triterpenóides) identificados no extracto dos frutos de *E. globulus* em éter de petróleo/acetona 1:1.

Atendendo a estes dados, observamos que os triterpenóides são a família de compostos mais abundante no extracto em petróleo/acetona da cera dos frutos,

representando cerca de 70 % do extracto quantificado, ou seja, 1,2 g/kg num total de 1,7 g/kg, constituindo 60% da cera total.

3.3.3 Teor em triterpenóides da cera superficial dos ramos do topo de *E. globulus*

O extracto da cera superficial dos ramos do topo apresenta rendimentos idênticos aos das folhas do topo verdes, de cerca de 0,7%. Este rendimento de extracção da cera dos ramos do topo com simples imersão em éter de petróleo/acetona a quente é da mesma ordem de grandeza do rendimento de extracção da casca total do tronco (0,8 - 0,9%), obtido por extracção com diclorometano em Soxhlet. Refira-se que, até à data, não foram encontrados estudos publicados acerca dos extractáveis desta fracção de biomassa do *E. globulus*.

Os compostos detectados por GC-MS no extracto da cera dos ramos do topo bem como a sua quantificação, apresenta-se na tabela 5.

Esta cera revelou uma composição rica em ácidos triterpénicos com predominância dos ácidos ursólico **56**, (0,84 g/kg), betulónico **51**, (0,62 g/kg), oleanólico **53**, (0,42 g/kg), e betulínico **54**, (0,22 g/kg). Para além destes, destacam-se ainda quantidades consideráveis dos ácidos 3-acetil-ursólico **60** e 3-acetil-oleanólico **58**. Na sua composição, destaca-se ainda a presença de quantidades consideráveis de alguns alcanos, sesquiterpenos, e álcoois sesquiterpénicos, compostos típicos das ceras de *E. globulus* [70, 87, 105, 111, 113].

Tabela 5: Composição o extracto em éter de petróleo/acetona 1:1 da cera superficial dos ramos do topo de *E. globulus*, derivatizado e analisado por GC-MS; Padrão interno: tetracosano; n.i. – não identificado.

Pico	Composto	M (mg/kg)
1	Eucaliptol	56,1
2	3-Heptanol	46,5
3	Glicerol	3,8
4	Cariofileno	4,8
5	Aromadendreno	26,2
6	Allo-aromadendreno	5,9
7 – 9	Alcool sesquiterpénico n.i.	44,9
10	Alditol n.i.	4,4
11	Ácido azeláico	4,0
12	Monossacarídeo	5,2
13	Ácido palmítico	7,5
14	Tetracosano (P.I.)	
15	Alcano	22,7
16	Alcano	61,7
17	1-tetracosanol	5,5
18	Alcano	9,9
19	Ácido tetracosanóico	7,5
20	Alcano	106,8
21	1-hexacosanol	14,5
22	Ácido hexacosanóico	9,5
23	1-octacosanol	13,7
24	Ácido octacosanoico + n.i.	12,1
25	β -sitosterol + estigmasterol	32,3
26	α -amirina	3,3
28	1-triacontanol	15,6
29 – 30	triterpenóides n.i.	212,9
31	Ácido triacontanóico	9,6
32	Triterpenóide n.i.	88,2
33	Ácido betulónico	615,5
34	3 β -hidroxi-urs-11-en-13 β (28)-olido + Ácido 3 β ,11 α -di-hidroxi-urs-12-en-28-óico + n.i.	284,4
35	Ácido oleanólico	422,9
36	Ácido betulínico	223,5
37	Ácido ursólico	844,0
38	Ácido 3-acetil-oleanólico	106,1
39	Ácido 3-acetil-ursólico	225,4
40 – 44	Triterpenóides n.i.	171,2
	Triterpenóides n.i.	472,3
	Não identificados	535,7
	Total triterpenóides	3194,3
	Total	4275,3

A figura 31 resume os resultados da quantificação do extracto da cera dos ramos do topo. Os dados apresentados indicam que os triterpenóides são a família de compostos mais abundante representando 75% do extracto quantificado, ou seja, 3,2 g/kg num total de 4,3 g/kg. Este grupo de compostos constitui 40% da cera total extraída.

Os teores em triterpenóides na cera dos ramos são da mesma ordem de grandeza dos observados no extracto em diclorometano da casca total do tronco (3 a 4 g/kg). Estes valores, aliados à simplicidade do método de extracção, conferem a esta fracção de biomassa do *E. globulus* elevadas potencialidades para a extracção de triterpenóides

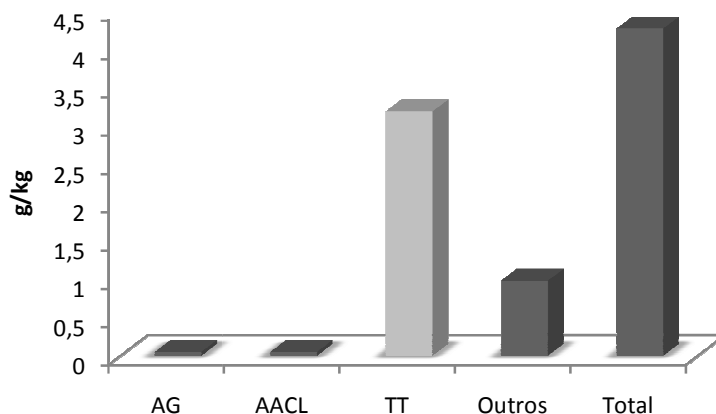


Figura 31: Quantificação das principais famílias de compostos (AG - Ácidos gordos, AACL - Álcoois alifáticos de cadeia longa, TT - Triterpenóides) identificados no extracto em éter de petróleo/acetona 1:1 dos ramos do topo de *E. globulus*.

Uma vez que o método de extracção utilizado na extracção da cera superficial dos ramos é sugerido normalmente para a extracção de ceras cuticulares das folhas e frutos do género *Eucalyptus* [70, 72, 87, 105], deduziu-se que os triterpenóides estariam concentrados na camada superficial desta fracção de biomassa, tal como acontece na casca do tronco.

No sentido de confirmar esta observação e comparar o teor em triterpenóides da camada superficial da casca dos ramos com a camada superficial da casca do tronco, realizou-se a extracção em diclorometano desta fracção superficial da casca dos ramos. Nos parágrafos seguintes será discutida a composição desse extracto.

3.3.4 Teor em triterpenóides da camada superficial da casca dos ramos

Os valores de rendimento obtidos para a camada superficial da casca dos ramos do topo são da ordem dos 18,1%. Este resultado é surpreendente quando comparado com o rendimento de 5,2% obtido para a fracção correspondente da casca do tronco e evidenciam a elevada abundância da fracção de extractáveis lipofílicos nas camadas superficiais relativamente às restantes fracções de casca do *E. globulus* estudadas, que se encontram entre 0,6 e 1,4%.

O cromatograma GC-MS típico do extracto camada superficial da casca dos ramos do topo em diclorometano, apresenta-se na figura 32.

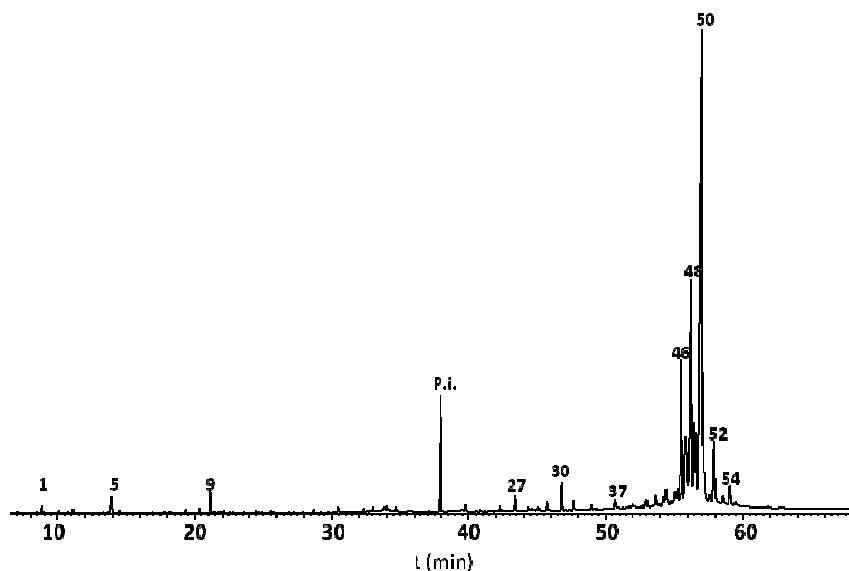


Figura 32: Cromatograma total do extracto em diclorometano da camada superficial da casca dos ramos de *E. globulus* derivatizado; A numeração refere-se à identificação dos compostos constantes na tabela 8; Padrão interno (PI): tetracosano.

Este extracto revelou uma composição particularmente rica em ácidos triterpénicos com predominância do ácido ursólico **50** com 55,7 g/kg num total de 132,1 g/kg, ou seja, 42% dos compostos quantificados. Os ácidos oleanólico **48** (18,75 g/kg), betulónico **46**, (11,55 g/kg) e betulínico **49** (8,11 g/kg), são também compostos abundantes neste extracto. Para além destes, destacam-se ainda quantidades consideráveis dos ácidos 3-acetil-ursólico **54** e 3-acetil-oleanólico **42**, derivados acetilados dos ácidos ursólico e

oleanólico que, por hidrólise alcalina, incrementariam ainda mais as quantidades finais daqueles ácidos.

Na figura 33 resume-se a composição dos extractos das camadas superficiais da casca dos ramos e do tronco. Pode observar-se que sendo os triterpenóides a família de compostos mais abundante em ambos os extractos, na camada superficial da casca dos ramos o seu teor é cerca de 4 vezes superior ao da camada superficial da casca do tronco, ou seja, 121,2 g/kg num total de 132,1 g/kg, representando cerca de 91,8% do extracto quantificado.

Estes resultados fazem desta fracção da biomassa a mais rica em triterpenóides de todas as fracções da biomassa de *E. globulus* analisadas e, portanto, uma das que deverá merecer mais atenção em termos de uma eventual exploração deste tipo de compostos.

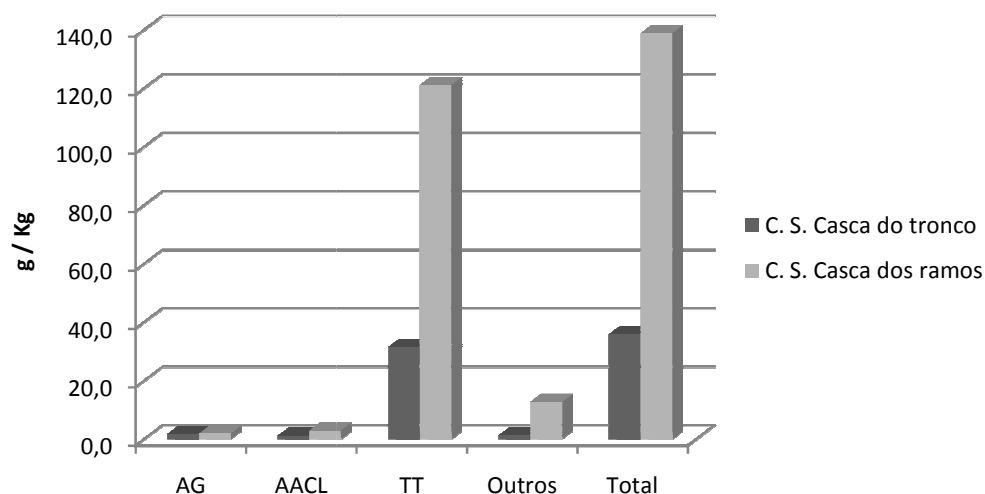


Figura 33: Quantificação das principais famílias de compostos (AG - Ácidos gordos, AACL - Álcoois alifáticos de cadeia longa, TT - Triterpenóides) identificados nos extractos em diclorometano das camadas superficiais (C.S.) da casca do tronco e dos ramos de *E. globulus*.

3.3.5 Análise comparativa dos teores em triterpenóides entre as ceras dos resíduos da biomassa de *E. globulus*

No sentido de sistematizar a informação discutida nos pontos anteriores no que diz respeito ao teor em triterpenóides das ceras extraídas a partir dos resíduos de *E. globulus*, nomeadamente, folhas juvenis (J), folhas do topo verdes (TV) e secas (TS), ramos do topo e frutos, apresenta-se um balanço global na figura 33. A quantificação do extracto em diclorometano da casca total do tronco da árvore é também apresentada como de referência comparativa.

As ceras das amostras de biomassa de *E. globulus* obtidas éter de petróleo/acetona apresentam composições ricas em triterpenóides, particularmente em ácidos triterpénicos com estruturas do tipo ursano, oleanano e lupano, que variam entre 1,2 g/kg e 5,1 g/kg. Das fracções de biomassa estudadas verifica-se que esta família de compostos é mais abundante nas ceras das folhas do topo e menos abundante nos frutos. As ceras das folhas, em geral, apresentam mesmo composições em triterpenóides superiores às obtidas na casca total do tronco, extraídos em Soxhlet com diclorometano, que rondam os 3,8 g/kg.

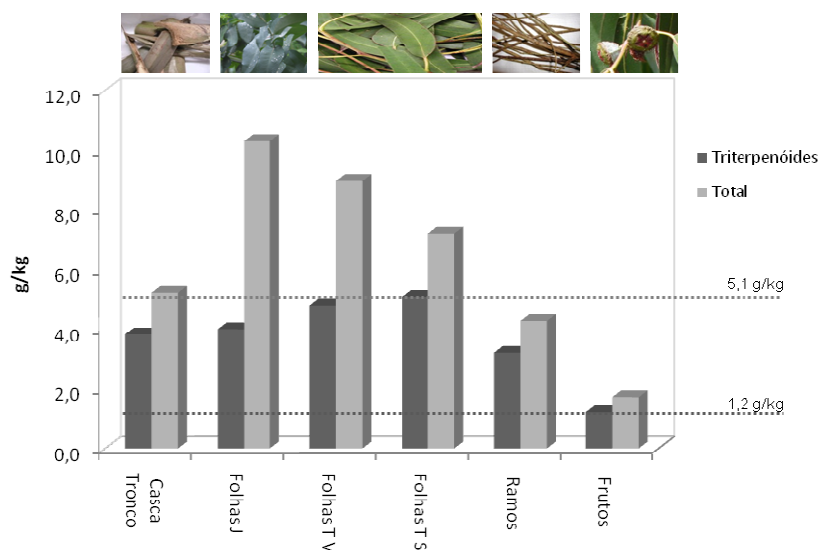


Figura 33: Teores em triterpenóides no extracto em diclorometano da casca do tronco, e nos extractos em éter de petróleo/acetona das folhas juvenis (J), folhas do topo verdes (TV) e secas (TS), ramos do topo e frutos de *E. globulus*.

No que diz respeito ao extracto das ceras dos ramos, apesar do teor de triterpenóides representar apenas 3,2 g/kg, refira-se que a sua casca, particularmente a camada superficial, apresenta teores (121 g/kg) muito superiores à restante biomassa de *E. globulus* estudada, conferindo a esta fracção aptidões excepcionais para a exploração dos triterpenóides, principalmente ácidos triterpénicos.

No geral, a composição destes extractos e a facilidade com que são obtidos, confere a estes resíduos de biomassa do *E. globulus* um potencial considerável para a exploração de triterpenóides.

Considerando a abundância dos triterpenóides na casca dos ramos do topo da árvore, pretendeu-se estudar se há uma tendência para os teores em triterpenóides da casca do tronco aumentarem desde a sua base até ao topo. Nesse sentido, discute-se no ponto seguinte a variação dos teores em triterpenóides da casca total ao longo do tronco.

3.3.6 Variabilidade do teor em triterpenóides na casca total do tronco

As composições dos extractos em diclorometano das várias secções de casca total do tronco, em geral, apresentando uma mistura entre os extractáveis das fracções de casca externa e interna [48], sendo os triterpenóides a família de compostos mais abundante, particularmente os ácidos ursólico, oleanólico, betulínico, 3-acetil-ursólico e 3-acetil-oleanólico e a β -amirina. O β -sitosterol e o ácido palmítico são também componentes relativamente abundantes.

Na figura 34 são apresentados os teores totais de triterpenóides e de componentes lipofílicos detectados nos extractos das várias secções de casca total do tronco. Pode observar-se que ocorrem variações significativas do teor em triterpenóides com a altura do tronco. Os teores variam entre 2,1 g/kg e 6,9 g/kg, sendo a casca da zona da base do tronco (0 - 1 m) a mais pobre nestes compostos e a zona do topo (16 - 17 m) a mais rica. Entre os 2 e 15 m de altura não se observam variações significativas no teor em triterpenoides (3 a 4 g/Kg), estando de acordo com o descrito na literatura [48].

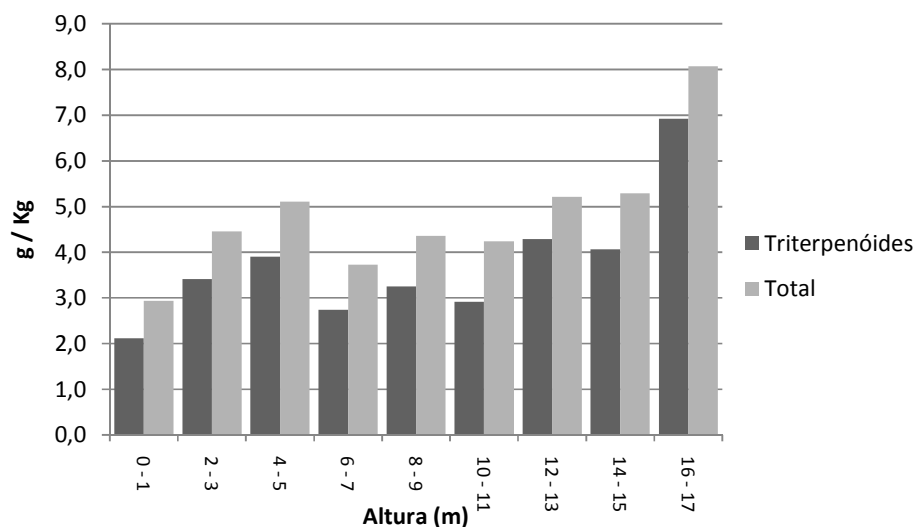


Figura 34: teores totais de triterpenóides e de componentes lipofílicos detectados nos extractos das várias secções da casca total do tronco de *E. globulus*.

Estes resultados permitem concluir que, efectivamente, os teores em triterpenóides da casca do tronco de *E. globulus* tendem a aumentar da base para o topo da árvore. Em conjunto com os elevados teores destes compostos observados na casca dos ramos, verifica-se que a casca da zona dos topos é, em geral, mais rica em triterpenóides que a restante casca do tronco.

3.3 Estudos preliminares de extracção da casca externa de *E. globulus* com CO₂ supercrítico

O CO₂ supercrítico (CO₂-SC) tem demonstrado ser um excelente solvente para a extracção de produtos naturais em alternativa aos métodos convencionais que usam solventes orgânicos [75, 76, 81, 82, 86, 114]. Os componentes das plantas extraídos em sistemas com CO₂-SC têm vastas naturezas químicas, abrangendo desde compostos com actividade antioxidante usados na indústria alimentar [81], a óleos essenciais [115] ou ceras vegetais [75].

A aplicação de sistemas de extracção com CO₂-SC a componentes da biomassa do género *Eucalyptus* é referida no isolamento de óleo essencial das folhas do *E. globulus* [116], de extractos com actividade antioxidante das folhas de *E. camaldulensis* [117] e de

extractáveis lipofílicos da madeira de *E. globulus* [84]. Contudo, não foi encontrada qualquer referência no que diz respeito à extracção da casca de *E. globulus* com CO₂-SC.

Neste trabalho foi feita uma primeira abordagem à aplicação da extracção com CO₂-SC à fracção da casca externa do *E. globulus*. É sabido que a extracção com fluidos supercríticos pode ser selectiva para determinadas substâncias através do controlo das condições de extracção como a pressão e temperatura [76]. Nesta abordagem foi apenas variada a pressão (180 e 200 bar) mantendo-se a temperatura constante (40 °). Ambos os ensaios apresentaram rendimentos de extracção da ordem de 0,8 % (m/m), muito abaixo dos 3 a 4 % obtidos com a extracção soxhlet em diclorometano desta fracção da casca [48]. Contudo, as extracções decorreram num tempo total de 3 horas, com um consumo total de CO₂ cerca de 1,50 Kg, e foram paradas num momento em que a extracção ainda se decorria, indicando que, prolongando o tempo de extracção, aumentaríamos também o rendimento final.

Foram recolhidas amostras de extracto a cada hora de extracção. As fracções recolhidas nos dois ensaios (a 180 e 200 bar) apresentam composições idênticas e são qualitativamente semelhantes aos extractos em diclorometano da casca externa do *E. globulus*. Os componentes mais abundantes são triterpenoides, particularmente os ácidos 3-acetil-ursólico e 3-acetil-oleanólico, β -amirina e β -sitosterol, seguidos por ácidos gordos, entre os quais os mais representativos são os ácidos palmítico, oleico e linoleico, e fracções menores de álcoois gordos. Comparativamente com o extracto em diclorometano, destacam-se os baixos teores, ou mesmo a ausência total dos ácidos ursólico e oleanólico, dois dos compostos mais abundantes na casca externa do *E. globulus* [48]. É sabido que compostos polares apresentam baixa solubilidade no CO₂-SC devido à natureza lipofílica deste solvente [76, 80, 84], pelo que a maior polaridade dos ácidos ursólico e oleanólico comparativamente com os seus derivados acetilados, constituintes mais abundantes destes extractos, pode ser uma possível explicação para este comportamento.

Na figura 34 apresentam-se, simultaneamente, a evolução dos teores em triterpenóides totais e em ácido 3-acetil-ursólico em função da massa de CO₂ gasta nas extracções a 180 e 200 bar. Note-se que o ácido 3-acetil-ursólico, para além de ser o

componente maioritário dos extractos, representa mais de 60% dos triterpenóides totais. A 180 bar, tanto os teores finais em triterpenóides totais (1,8 g) como em ácido 3-acetil-ursólico (1,1), são superiores aos obtidos a 200 bar (1,5 e 1,0 g, respectivamente). No entanto, a tendência crescente dos teores em ambos os ensaios indicam que a extracção não foi completa, pelo que deveria ter seguido durante mais tempo até à estabilização destes valores.

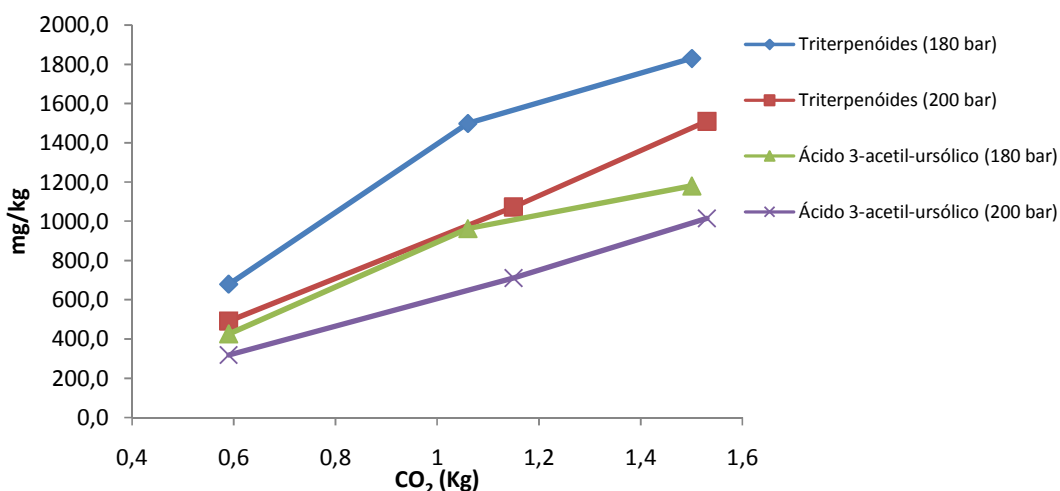


Figura 34: Evolução dos teores em triterpenóides totais e em ácido 3-acetil-ursólico em função da massa de CO₂ gasta nas extracções a 180 e 200 bar.

Em geral, a selectividade para os triterpenóides aumenta com o decorrer da extracção, ou seja, nas condições usadas, extrem-se primeiro grandes quantidades de compostos indesejados (figura 35). A primeira fracção recolhida (cerca de 1 h de extracção) é a menos selectiva, com composições em triterpenóides entre 11 e 14%, aumentando até 34 a 38 % no final da extracção (cerca de 3 h de extracção).

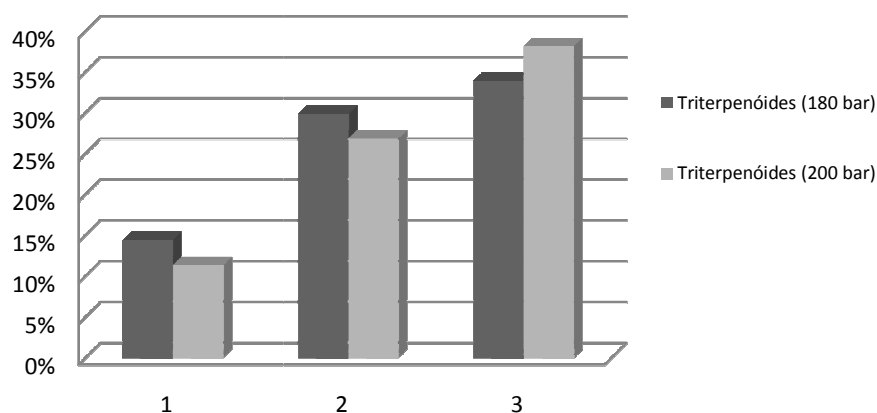


Figura 35: Evolução da selectividade (% no extracto) para os triterpenóides em função do tempo de extracção a 180 e 200 bar.

A solubilidade de um composto alvo no fluido supercrítico é um factor determinante para a eficiência da extracção. A temperatura e a densidade do fluido controlam essa solubilidade. Por isso, a escolha da densidade apropriada do CO₂-SC tem uma importância crucial no seu poder solvente e na sua selectividade, sendo determinante na composição do extracto [118]. É usualmente recomendado realizar a extracção do composto pretendido imediatamente acima do ponto em que ele se torna solúvel no CO₂-SC de forma a minimizar a extracção de outros compostos indesejados [76]. Nesse sentido, este estudo necessitaria de mais desenvolvimento de forma a encontrar a combinação de pressão e temperatura ideais para a extracção dos triterpenóides e avaliar o seu possível fraccionamento. Por outro lado, seria necessário testar a modificação com co-solventes [76] para a extracção dos triterpenóides não extraídos apenas com CO₂-SC e que são abundantes na casca externa do *E. globulus*, como é o caso dos ácidos ursólico e oleanólico.

4 Conclusões e Trabalho futuro

Os resíduos de biomassa de *E. globulus*, principalmente os resíduos resultantes dos topos das árvores, apresentam elevadas potencialidades para a eventual exploração dos triterpenóides com elevado valor, particularmente de ácidos triterpénicos do tipo ursano e oleanano.

Observou-se que estes compostos estão concentrados nas camadas superficiais da biomassa analisada, sendo os seus teores especialmente elevados nas fracções superficial da casca do tronco e, mais ainda, na casca dos ramos.

Porém, a exploração dos triterpenóides a partir dos resíduos florestais de *E. globulus* a nível industrial tem, segundo indicações da própria indústria, limitações logísticas e económicas. Essas limitações relacionam-se, essencialmente, com a separação dos resíduos de *E. globulus* da restante biomassa florestal que alimenta a caldeira de biomassa na unidade fabril. Nesse sentido, a exploração dos triterpenóides deve centrar-se, numa primeira fase, na exploração da casca do tronco que é separada na fábrica.

Verificou-se que os processos de descasque assumem particular relevância no que respeita à remoção da fracção superficial da casca externa do tronco, rica em triterpenóides. Consequentemente, a casca processada (casca industrial) apresenta baixos teores destes compostos e, por isso, não se recomenda a sua exploração a partir deste material.

A exploração dos triterpenóides da casca deve antes centrar-se na extracção da sua camada superficial, dada a sua abundância nestes compostos. Nesse sentido, devem ser desenvolvidos sistemas de separação da camada superficial da casca do tronco antes da rolaria entrar no processo de descasque. Esta abordagem tem como vantagem reduzir o volume de material a extrair e, consequentemente, reduzir os volumes de solventes e as capacidades dos sistemas de extracção a usar.

No que diz respeito ao uso de tecnologias “verdes”, a extracção dos triterpenóides com CO₂-SC assume-se, à partida, como uma alternativa viável aos solventes orgânico.

Contudo, neste campo, é ainda necessário desenvolver e otimizar as condições de extracção e os sistemas a implementar.

4.1 Trabalho futuro

A completa caracterização dos triterpenóides da biomassa de *E. globulus* é importante para sua eventual exploração. Considerando a abundância de alguns compostos triterpénicos para os quais não se obteve uma identificação clara nos extractos dos diversos tipos de biomassa, particularmente nas folhas, seria relevante a realização de estudos detalhados no sentido da sua identificação inequívoca. Para além dos referidos triterpenóides, a extracção eficiente e a identificação inequívoca dos sesquiterpenos e álcoois sesquiterpénicos presentes nas ceras das folhas e frutos através de métodos mais adequados, seria também importante para a valorização adicional dos resíduos de biomassa de *E. globulus* já que alguns destes compostos têm um considerável valor comercial.

Partindo do princípio que a exploração dos triterpenóides da casca de *E. globulus* deve centrar-se na extracção das suas camadas superficiais, é importante desenvolver sistemas de separação eficientes desta fracção superficial da restante casca.

No sentido de desenvolver processos de extracção mais eficientes, seria ainda importante estudar aprofundadamente os factores responsáveis pela acentuada diminuição dos teores em triterpenóides da casca durante os processamentos de descasque. Zonas de acesso limitado com a linha de descasque em pleno funcionamento, como o pré-descascador ou o descascador rotativo, podem revelar outros possíveis pontos de acumulações dentro da maquinaria. Estes pontos poderem ser relevantes para a recolha de amostras representativas da fracção superficial da casca, a mais rica em compostos triterpénicos, que é removida durante os processamentos mecânicos de descasque.

O desenvolvimento de metodologias de extracção dos triterpenóides com CO₂ supercrítico será uma etapa fundamental no desenvolvimento futuro do aproveitamento

deste tipo de compostos. Nesse sentido, devem ser desenvolvidos modelos que permitam o controlo da selectividade e do rendimento em função da pressão e da temperatura, testando adicionalmente a possível utilização de co-solventes orgânicos para optimizar as condições de extracção e o possível fraccionamento dos referidos compostos. Dada a complexidade termodinâmica destes sistemas, a obtenção de um modelo que permita compreender os mecanismos de extracção dos triterpenóides será um factor determinante para a passagem da escala laboratorial à escala industrial.

Referências

1. Okkerse C., van Bakkum H., From fossil to green. *Green Chem.*, **1999**, 1(2), 107-114.
2. *Innovation Roadmap on Bio-based Feedstocks, Fuels and Industrial Products*. **2008**, Disponível em: <http://www.cbin.gc.ca/Docs/english/Innovation-roadmap04.pdf>
3. Clark J.H., Budarin V., Deswarte F.E.I., Hardy J.J.E., Kerton F.M., Hunt A.J., Luque R., Macquarrie D.J., Milkowski K., Rodriguez A., Samuel O., Tavener S.J., White R.J., Wilson A.J., Green chemistry and the biorefinery: A partnership for a sustainable future. *Green Chem.*, **2006**, 8(10), 853-860.
4. Kamm B., Kamm M., The concept of biorefinery - Production of platform chemicals and final products. *Chem. Ing. Tech.*, **2007**, 79(5), 592-603.
5. Kamm B., Kamm M., Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2004**, 64(2), 137-145.
6. Kamm B., Kamm M., Biorefinery - Systems. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **2004**, 18(1), 1-6.
7. Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J., Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T., The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, **2006**, 311(5760), 484-489.
8. Bruce E.D., Did the NPRA mislead the US Senate on ethanol potential? *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, **2007**, 1(4), 243-244.
9. *Outputs from the EPOBIO Workshop: Products from plants - From crops and forests to zero waste biorefineries*. **2006**, Disponível em: www.epobio.net
10. Fernando S., Adhikari S., Chandrapal C., Murali N., Biorefineries: Current status, challenges, and future direction. *Energy Fuels*, **2006**, 20(4), 1727-1737.
11. Kamm B., Kamm M., Schmidt M., Hirth T., and Schulze M., Lignocellulose-based Chemical Products and Product Family Trees, in *Biorefineries - Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*, Kamm B., Gruber P., and M. Kamm, (Eds.). **2006**, Wiley-VCH Weinheim, 97-150.
12. *Boletim Estatístico 2006*. **2007**, CELPA - Associação da Indústria Papeleira 44.
13. Quilho T., Pereira H., Richter H.G., Variability of bark structure in plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Iawa Journal*, **1999**, 20(2), 171-180.
14. Canaveira P., *A Floresta e o Protocolo de Quioto*. **2006**, Disponível em: www.celpa.pt

15. Murzin D.Y., Maki-Arvela P., Salmi T., Holmbom B., Catalytic transformations for production of fine chemicals and pharmaceuticals from wood-derived raw materials. *Chem. Eng. Technol.*, **2007**, 30(5), 569-576.
16. Sjode A., Alriksson B., Jonsson L.J., Nilvebrant N.O., The potential in bioethanol production from waste fiber Sludges in pulp mill-based biorefineries. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2007**, 137, 327-337.
17. *Forest Products Industry: Technology Roadmap*. **2006**, Disponível em: www.agenda2020.org
18. Axegard P., Backlund B., Warnqvist B., The Eco-Cyclic pulp mill: Focus on closure, energy-efficiency and chemical recovery development. *Pulp Pap.-Can.*, **2002**, 103(5), 26-29.
19. Sjostrom E., Wood Polysaccharides, in *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. **1993**, Academic Press, San Diego, 49-67.
20. Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A., Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44(22), 3358-3393.
21. Bledzki A.K., Gassan J., Composites reinforced with cellulose based fibres. *Prog. Polym. Sci.*, **1999**, 24(2), 221-274.
22. Smook G.A., *Handbook for Pulp & Paper Technologists*. 1990, Atlanta: TAPPI Press.
23. Sjostrom E., Lignin, in *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. **1993**, Academic Press, San Diego, 68-82.
24. Holladay J.E., White J.F., Bozell J.J., Johnson D., *Top Value-Added Chemicals from Biomass: Vol II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin*. **2007**, Disponível em: http://www.pnl.gov/main/publications/external/technical_reports/PNNL-16983.pdf
25. Arato C., Pye E.K., Gjennestad G., The lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2005**, 121, 871-882.
26. Ingram L., Mohan D., Bricka M., Steele P., Strobel D., Crocker D., Mitchell B., Mohammad J., Cantrell K., Pittman C.U., Pyrolysis of wood and bark in an auger reactor: Physical properties and chemical analysis of the produced bio-oils. *Energy Fuels*, **2008**, 22(1), 614-625.
27. Eckert C., Liotta C., Ragauskas A., Hallett J., Kitchens C., Hill E., Draucker L., Tunable solvents for fine chemicals from the biorefinery. *Green Chem.*, **2007**, 9(6), 545-548.
28. Sjostrom E., Extractives, in *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. **1993**, Academic Press, San Diego, 92-107.
29. Ekman R., Holmbom B., in *Pitch Control, Wood Resin and Deresination*, Back E., Allen L.H., (Eds.). **2000**, TAPPI Press, Atlanta, 37-76.

30. Foran C.D., Impact of Recent Pulp-Mill Modifications on Sulfur Contents in Crude Sulfate Turpentine. *Tappi J.*, **1995**, 78(6), 93-101.
31. Sadhra S., Foulds I.S., Gray C.N., Koh D., Gardiner K., Colophony - Uses, Health-Effects, Airborne Measurement and Analysis. *Ann. Occup. Hyg.*, **1994**, 38(4), 385-396.
32. Fernandes P., Cabral J.M.S., Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresour. Technol.*, **2007**, 98(12), 2335-2350.
33. Pietarinen S.P., Willfor S.M., Ahotupa M.O., Hemming J.E., Holmbom B.R., Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *J. Wood Sci.*, **2006**, 52(5), 436-444.
34. Willfor S., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B., Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stemwood. *Holzforschung*, **2003**, 57(4), 359-372.
35. Willfor S., Nisula L., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B., Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2: Knots and stemwood of fir species. *Holzforschung*, **2004**, 58(6), 650-659.
36. Willfor S., Nisula L., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B., Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. *Holzforschung*, **2004**, 58(4), 335-344.
37. Ahotupa M., Eckerman C., Kangas L., Mäkelä S., Saarinen N., Santti R., Wärrä A., *Food additive or product or a pharmaceutical preparation, comprising hydroxymatairesinol*, US Patent 6689809 **2004**.
38. Disponível em: <http://www.linnea-worldwide.com/products/7-hydroxymatairesinol.asp>. (consultado em Maio 2008)
39. Hasselwander O., Kramer K., Jentzsch A., Schein K., Haremza S., *Use of lignans in cosmetic or dermatological preparations*, WO Patent 2005/048970, **2005**.
40. Hamunen A., *Process for the purification of β -sitosterol isolated from the unsaponifiables in crude soap from the sulphate cellulose process*, US Patent 4422974, **1983**
41. Niemela K., *Low-molecular-weight organic compounds in brich kraft black liquor*, **1990**, Helsinki University of Technology,
42. Huibers D., Robbins A., Sullivan D., *Method for separating sterols from tall oil*, Patent 6107456, **2000**.
43. Moreau R.A., Whitaker B.D., Hicks K.B., Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.*, **2002**, 41(6), 457-500.
44. Miettinen T., Vanhanen H., Wester I., *Use of a stanol fatty acid ester for reducing serum cholesterol level* US Patent 5502045, **1996**.

45. Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid esters in the wood of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung*, **2002**, 56(2), 143-149.
46. Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Oxidized derivatives of lipophilic extractives formed during hardwood Kraft pulp bleaching. *Holzforschung*, **2003**, 57(5), 503-512.
47. Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* kraft pulps. Behavior during ECF bleaching. *J. Wood Chem. Technol.*, **2005**, 25(1-2), 67-80.
48. Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Cavaleiro J.A.S., Lipophilic extractives of the inner and outer barks of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung*, **2002**, 56(4), 372-379.
49. Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Evtuguin D.V., Effect of oxygen, ozone and hydrogen peroxide bleaching stages on the contents and composition of extractives of *Eucalyptus globulus* kraft pulps. *Bioresour. Technol.*, **2006**, 97(3), 420-428.
50. Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Pereira C.C.L., Neto C.P., Cavaleiro J.A.S., New lipophilic components of pitch deposits from an *Eucalyptus globulus* ECF bleached kraft pulp mill. *J. Wood Chem. Technol.*, **2002**, 22(1), 55-66.
51. Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Silva A.M.S., Neto C.P., Domingues P., New glucosides from *Eucalyptus globulus* wood, bark and kraft pulps. *Holzforschung*, **2004**, 58(5), 501-503.
52. Aggarwal B.B., Shishodia S., Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, 71(10), 1397-1421.
53. Alakurtti S., Mäkelä T., Koskimies S., Yli-Kauhaluoma J., Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2006**, 29(1), 1-13.
54. Bouic P.J.D., Etsebeth S., Liebenberg R.W., Albrecht C.F., Pegel K., Van Jaarsveld P.P., Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int. J. Immunopharmacol.*, **1996**, 18(12), 693-700.
55. Donald P.R., Lamprecht J.H., Freestone M., Albrecht C.F., Bouic P.J.D., Kotze D., van Jaarsveld P.P., A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **1997**, 1(6), 518-522.
56. Gupta M.B., Nath R., Gupta G.P., Bhargava K.P., *Anti-Ulcer Activity of Some Plant Triterpenoids*, in *Indian J. Med. Res.* **1981**, 649-652.
57. Gupta M.B., Nath R., Srivastava N., Shanker K., Kishor K., Bhargava K.P., Anti-Inflammatory and Anti-Pyretic Activities of Beta-Sitosterol. *Planta Med.*, **1980**, 39(2), 157-163.

58. Huang M.T., Ho C.T., Wang Z.Y., Ferraro T., Lou Y.R., Stauber K., Ma W., Georgiadis C., Laskin J.D., Conney A.H., Inhibition of Skin Tumorigenesis by Rosemary and Its Constituents Carnosol and Ursolic Acid. *Cancer Res.*, **1994**, 54(3), 701-708.
59. Liu J., Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.*, **1995**, 49(2), 57-68.
60. Liu J., Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 100(1-2), 92-94.
61. Pegel K.H., The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *S. Afr. J. Sci.*, **1997**, 93(6), 263-268.
62. Sattar A.A., Bankova V., Kujumgiev A., Galabov A., Ignatova A., Todorova C., Popov S., Chemical-Composition and Biological-Activity of Leaf Exudates from Some Lamiaceae Plants. *Pharmazie*, **1995**, 50(1), 62-65.
63. Shishodia S., Majumdar S., Banerjee S., Aggarwal B.B., Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappa B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: Correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res.*, **2003**, 63(15), 4375-4383.
64. Sosa S., Altinier G., Politi M., Braca A., Morelli I., Della Loggia R., Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, **2005**, 12(4), 271-277.
65. Tian Z., Lin G., Zheng R.X., Huang F., Yang M.S., Xiao P.G., Anti-hepatoma activity and mechanism of ursolic acid and its derivatives isolated from *Aralia decaisneana*. *World Journal of Gastroenterology*, **2006**, 12(6), 874-879.
66. Rozner S., Garti N., The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2006**, 282-283, 435-456.
67. Van Heiningen A., Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. *Pulp Pap.-Can.*, **2006**, 107(6), 38-43.
68. Quilho T., Pereira H., Within and between-tree variation of bark content and wood density of *Eucalyptus globulus* in commercial plantations. *Iawa Journal*, **2001**, 22(3), 255-265.
69. Quilez J., Garcia-Lorda P., Salas-Salvado J., Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin. Nutr.*, **2003**, 22(4), 343-351.
70. Pereira S.I., Freire C.S.R., Neto C.P., Silvestre A.J.D., Silva A.M.S., Chemical composition of the epicuticular wax from the fruits of *Eucalyptus globulus*. *Phytochem. Anal.*, **2005**, 16(5), 364-369.
71. Li H., Madden J.L., Analysis of Leaf Oils from a *Eucalyptus* Species Trial. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1995**, 23(2), 167-177.

72. Li H., Madden J.L., Potts B.M., Variation in leaf waxes of the Tasmanian Eucalyptus species .1. Subgenus Symphyomyrtus. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1997**, 25(7), 631-657.
73. Conde E., Cadahia E., GarciaVallejo M.C., Low molecular weight polyphenols in leaves of Eucalyptus camaldulensis, E-globulus and E-rudis. *Phytochem. Anal*, **1997**, 8(4), 186-193.
74. Takahashi T., Kokubo R., Sakaino M., Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculata. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2004**, 39(1), 60-64.
75. Deswarte F.E.I., Clark J.H., Hardy J.J.E., Extraction of high-value chemicals from wheat straw by supercritical carbon dioxide. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **2005**, 230, U61-U62.
76. Wang L., Weller C.L., Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.*, **2006**, 17(6), 300-312.
77. Sithole B.B., Modern methods for the analysis of extractives from wood and plup - A review. *Appita J.*, **1992**, 45(4), 260-264.
78. Vinatoru M., An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.*, **2001**, 8(3), 303-313.
79. Kaufmann B., Christen P., Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal*, **2002**, 13(2), 105-113.
80. Daintree L.S., Kordikowski A., York P., Separation processes for organic molecules using SCF Technologies. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60(3), 351-372.
81. Diaz-Reinoso B., Moure A., Dominguez H., Parajo J.C., Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54(7), 2441-2469.
82. Rosa P.T.V., Angela M., Meireles A., Supercritical technology in Brazil: system investigated (1994-2003). *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34(2), 109-117.
83. Beckman E.J., Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. *J. Supercrit. Fluids*, **2004**, 28(2-3), 121-191.
84. Gonzalez-Vila F.J., Bautista J.M., Gutierrez A., Del Rio J.C., Gonzalez A.G., Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from Eucalyptus globulus wood. *J. Biochem. Bioph. Methods*, **2000**, 43(1-3), 345-351.
85. Zosel K., *Process for the decaffeination of coffee* US Patent 4247570, **1981**.
86. Brunner G., Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J. Food Eng.*, **2005**, 67(1-2), 21-33.
87. Wollenweber E., Kohorst G., Epicuticular leaf flavonoids from Eucalyptus species and from Kalmia-Latifolia. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, **1981**, 36(11-1), 913-915.

88. Ekman R., The Suberin Monomers and Triterpenoids from the Outer Bark of *Betula-Verrucosa* Ehrh. *Holzforschung*, **1983**, 37(4), 205-211.
89. Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P., GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. *Chia*. *Biomed. Chromatogr.*, **2005**, 19(8), 586-605.
90. Gutierrez A., del Rio J.C., Gas chromatography/mass spectrometry demonstration of steryl glycosides in eucalypt wood, Kraft pulp and process liquids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15(24), 2515-2520.
91. Gutierrez A., del Rio J.C., Gonzalez-Vila F.J., Martin F., Chemical composition of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. *Holzforschung*, **1999**, 53(5), 481-486.
92. Mathe C., Culioli G., Archier P., Vieillescazes C., Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1023(2), 277-285.
93. Oleszek W., Bialy Z., Chromatographic determination of plant saponins--An update (2002-2005). *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112(1-2), 78-91.
94. Pelillo M., Lafelice G., Marconi E., Caboni M., Identification of plant sterols in hexaploid and tetraploid wheats using gas chromatography with mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, 17(20), 2245-2252.
95. Rahier A., Benveniste, P., Mass spectral identification of phytosterols, in *Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids*, Nes, W.a.P., E., Editor. **1989**, Academic Press, Inc., San Diego, 223-248.
96. Razborsek M.I., Voncina D.B., Dolecek V., Voncina E., Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia*, **2008**, 67(5-6), 433-440.
97. Budzikiewicz H., Wilson J.M., Djerassi C., Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. 32 pentacyclic triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85(22), 3688-&.
98. Burnoufradosevich M., Delfel N.E., England R., Gas chromatography-mass spectrometry of oleanane-type and ursane-type triterpenes - Application chenopodium-quinoa triterpenes. *Phytochemistry*, **1985**, 24(9), 2063-2066.
99. Shiojima K., Arai Y., Masuda K., Takase Y., Ageta T., Ageta H., Mass-spectra os pentacyclic triterpenoids. *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40(7), 1683-1690.
100. Sharkey A.G., Friedel R.A., Langer S.H., Mass spectra of trimethylsilyl derivatives. *Anal. Chem.*, **1957**, 29(5), 770-776.
101. Gutierrez A., del Rio J.C., Gonzalez-Vila F.J., Romero J., Variation in the composition of wood extractives from *Eucalyptus globulus* during seasoning. *J. Wood Chem. Technol.*, **1998**, 18(4), 439-446.

102. Dias J., *Utilização da biomassa: avaliação dos resíduos e utilização de pellets em caldeiras domésticas*, **2002**, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
103. Fernandes P., *Residual biomass in the Vale do Sousa region, Northern Portugal*, **1998**, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
104. Gaydou E.M., Faure R., Wollenweber E., b-Amyrin acetate epoxide from *Canarina canariensis*. *Phytochemistry*, **1996**, 42(4), 1115-1118.
105. Wirthensohn M.G., Sedgely M., Jones G.P., Epicuticular wax of juvenile *Eucalyptus* leaves and headspace analysis of leaf volatiles. *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12(4), 401-411.
106. Wollenweber E., Doerr M., Siems K., Faure R., Bombarda I., Gaydou E.M., Triterpenoids in lipophilic leaf and stem coatings. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1999**, 27(1), 103-105.
107. Wollenweber E., Wehde R., Dorr M., Lang G., Stevens J.F., C-Methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry*, **2000**, 55(8), 965-970.
108. Siddiqui B.S., Farhat, Begum S., Siddiqui S., Isolation and structural elucidation of acylated pentacyclic triterpenoids from the leaves of *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtus*. *Planta Med.*, **1997**, 63(1), 47-50.
109. Rameshwar, Occurrence of Ursolic and Related Compounds in *Eucalyptus hybrid* Leaves. *Curr. Sci.*, **1987**, 56, 670-671.
110. Jones T.H., Potts B.M., Vaillancourt R.E., Davies N.W., Genetic resistance of *Eucalyptus globulus* to autumn gum moth defoliation and the role of cuticular waxes. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere*, **2002**, 32(11), 1961-1969.
111. Silvestre A., Cavaleiro J., Delmond B., Filliatre C., Bourgeois G., The essential oil of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal. *Flavour Fragr. J.*, **1994**, 9(2), 51-53.
112. Silvestre A.J.D., Cavaleiro J.A.S., Delmond B., Filliatre C., Bourgeois G., Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill from Portugal using multivariate statistical analysis. *Ind. Crop. Prod.*, **1997**, 6(1), 27-33.
113. Pereira S.I., Freire C.S.R., Neto C.P., Silvestre A.J.D., Silva A.M.S., Chemical composition of the essential oil distilled from the fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal. *Flavour Fragr. J.*, **2005**, 20(4), 407-409.
114. Fred J. Eller J.W.K., Supercritical carbon dioxide extraction of cedarwood oil: a study of extraction parameters and oil characteristics. *Phytochem. Anal.*, **2000**, 11(4), 226-231.
115. Reverchon E., Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. Supercrit. Fluids*, **1997**, 10(1), 1-37.
116. Della Porta C., Porcedda S., Marongiu B., Reverchon E., Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction. *Flavour Fragr. J.*, **1999**, 14(4), 214-218.

117. El-Ghorab A.H., El-Massry K.F., Marx F., Fadel H.M., Antioxidant activity of Egyptian Eucalyptus camaldulensis var. brevirostris leaf extracts. *Nahrung-Food*, **2003**, 47(1), 41-45.
118. Cherchi G., Deidda D., De Gioannis B., Marongiu B., Pompei R., Porcedda S., Extraction of Santolina insularis essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour Fragr. J.*, **2001**, 16(1), 35-43.